

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**



**Dottorato di Ricerca in Biologia applicata  
XXIV ciclo**

**Studio della relazione tra stress ambientale ed  
escrezione azotata in *Danio rerio*: un approccio  
comparato**

**Docente Guida  
Prof. Claudio Agnisola  
Coordinatore  
Prof. Ezio Ricca**

**Dottoranda  
Erminia Uliano**

**Tesi di Dottorato 2011**

## Sommario

1. Obiettivi generali e scopi specifici .....	4
2. Introduzione .....	6
2.1 Stress da variazioni di temperatura .....	8
2.1 Stress da variazioni di salinità .....	9
2.3 Stress da variazioni di ossigeno disciolto .....	11
2.4 Stress da variazione di nitrito ambientale .....	15
2.4.1 L'azoto inorganico nell'ambiente acquatico: $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}_3^-$ .....	15
2.4.2 Assunzione nitrito nei teleostei d'acqua dolce .....	18
2.4.3 Assunzione nitrito nei teleostei di acqua di mare .....	19
2.4.4 Il nitrito: ruolo fisiologico .....	20
2.4.5 Il nitrito: tossicità e suoi effetti .....	24
2.4.6 Detossificazione da accumulo di nitrito .....	26
2.4.7 Effetto del nitrito sull'escrezione azotata .....	27
2.5 Escrezione azotata nei teleostei .....	28
2.5.1 Ammoniaca .....	28
2.5.2 Urea .....	28
2.5.3 Acido urico .....	30
2.5.4 Ammoniogenesi nei pesci .....	30
2.5.5 Ureogenesi nei pesci .....	31
3. Materiali e metodi .....	37
3.1 Animali .....	37
3.1.1 Determinazione del condition factor (K) .....	39
3.2 Metodi .....	40
3.2.1 Determinazione del consumo di ossigeno in condizioni routine ( $\text{rMO}_2$ ) .....	40
3.2.2 Determinazione dell'escrezione di ammonio, urea e nitrito .....	45
3.2.3 Preparazione dei campioni di sangue e di omogenato muscolare .....	45
3.2.3 Saggi chimici e biochimici .....	49
3.3 Protocolli sperimentali .....	59
3.3.1 Stress da salinità in pesce zebra e gambusia .....	59
3.3.2 Stress da temperatura in pesce zebra e gambusia .....	59
3.3.3 Stress combinato da salinità e temperatura in pesce zebra e gambusia .....	59
3.3.4 Stress da nitrito e da ipossia ambientale .....	60
3.3.5 Stress combinato da nitrito e ipossia .....	63
3.3.6 Composizione dell'acqua di fonte usata come base per la preparazione dell'acqua per le vasche .....	64
3.4 Statistica .....	64
4. Risultati .....	65
4.1 Livelli normali dei parametri valutati in pesce zebra .....	65
4.2 Effetto di variazioni acute di salinità su $\text{rMO}_2$ , attività e escrezione azotata in pesce zebra e gambusia .....	66
4.3 Effetto dell'abbassamento acuto della temperatura su $\text{rMO}_2$ , attività e escrezione azotata in pesce zebra e gambusia .....	67
4.4 Effetto di variazioni acute di salinità e temperatura su $\text{rMO}_2$ , attività e escrezione azotata in pesce zebra e gambusia .....	72
4.5 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli di emoglobina, metaemoglobina e nitrosilemoglobina in pesce zebra e carassio dorato .....	74
4.6 Effetto acuto del nitrito ambientale sul consumo di ossigeno ed escrezione azotata in pesce zebra e carassio dorato .....	76

4.7 Effetto acuto del nitrito ambientale sul contenuto proteico del tessuto muscolare in pesce zebra e carassio dorato .....	79
4.8 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli di nitrito, lattato ed urea nel sangue e nel tessuto muscolare in pesce zebra e carassio dorato .....	80
4.9 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli di arginasi muscolare e degli enzimi del ciclo dell'urea in pesce zebra e carassio dorato .....	85
4.10 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli degli enzimi del ciclo dell'urea in pesce zebra .....	85
4.11 Effetto dell'ipossia acuta sull'escrezione di ammonio ed azoto ureico in pesce zebra e carassio dorato .....	87
4.12 Effetto dell'ipossia acuta sui livelli ematici di lattato, azoto ureico e nitrito in pesce zebra e carassio dorato .....	88
4.13 Effetto dell'ipossia acuta sui livelli muscolari di lattato, ammonio ed azoto ureico in pesce zebra e carassio dorato .....	90
4.14 Effetto dell'ipossia acuta sull'attività dell'arginasi in pesce zebra e carassio dorato .....	92
4.15 Effetto del trattamento acuto con nitrito durante esposizione acuta ad ipossia ambientale sull'escrezione azotata in pesce zebra e carassio dorato .....	93
4.16 Effetto del trattamento acuto con nitrito durante esposizione acuta ad ipossia ambientale sui livelli ematici di nitrito, urea e lattato in pesce zebra e carassio dorato .....	94
4.17 Effetto della combinazione dell'esposizione acuta ad ipossia severa con il trattamento acuto con nitrito ambientale sui livelli muscolari di nitrito, ammonio, urea, lattato ed enzima arginasi .....	96
4.18 Effetto del trattamento acuto con nitrito durante esposizione acuta ad ipossia ambientale sull'attività dell'arginasi muscolare in pesce zebra e carassio dorato .....	97
5. Discussione.....	100
5.1 Metabolismo di routine ed escrezione azotata in pesce zebra.....	100
5.2 Stress da salinità e temperatura .....	102
5.3 Stress da nitrito ed ipossia: ipossia funzionale vs ipossia ambientale.....	105
5.3.1 Nitrito ambientale ed emoglobina .....	106
5.3.2 Effetti del nitrito ambientale su metabolismo ed escrezione azotata .....	106
5.3.3 Effetti dell'ipossia acuta severa e della sua combinazione con lo stress da nitrito su metabolismo ed escrezione azotata .....	110
6. Conclusioni.....	115
Appendice.....	117
Bibliografia.....	123

## 1. Obiettivi generali e scopi specifici

La velocità di escrezione di ammonio e urea di un organismo permette di valutarne il bilancio azotato e fornisce un utile strumento in grado di dare informazioni sugli effetti dei fattori ambientali e nutrizionali sul metabolismo proteico (Rychly and Marina, 1977; Jobling, 1981; Perera et al., 1995; Frick and Wright, 2002; Fournier et al., 2003). Il presente studio si è rivolto alla valutazione, con approccio comparato, del rapporto fra stress ambientale ed escrezione azotata in ambienti di acqua dolce, utilizzando il pesce zebra (*Danio rerio*) come specie modello, e confrontando le risposte alle seguenti condizioni di stress acuto: i. aumento di salinità; ii. abbassamento della temperatura; iii. ipossia funzionale indotta da nitrito; iv. ipossia ambientale.

Questo studio comparato fra diversi tipi di stress e diverse specie ha avuto l'obiettivo di individuare:

- 1) eventuali risposte generalizzate e specifiche alle situazioni di stress ambientali in acqua dolce, che coinvolgono il catabolismo di proteine e aminoacidi, anche al fine di valutare la possibilità che un parametro di performance funzionale quale l'escrezione azotata possa essere proposto come valido strumento per la valutazione dello stress ambientale in acque dolci;
- 2) validità del pesce zebra come specie modello per la valutazione dello stress ambientale.

Le risposte del pesce zebra agli stress da salinità e temperatura sono state confrontate con quelle di una specie nota per la sua elevata tolleranza a questi tipi di stress, la gambusia (*Gambusia affinis*). In questa prima fase sono stati valutati solo i parametri metabolici, metabolismo ed attività di routine e velocità di escrezione di ammonio ed urea. È stato anche valutato l'effetto dell'azione combinata di questi due tipi di stress.

Le risposte del pesce zebra agli stress da ipossia funzionale da nitrito e ipossia ambientale sono state confrontate con quelle di carassio dorato (*Carassius auratus*), una specie nota per la sua elevata tolleranza all'ipossia. In questa seconda fase, la risposta degli animali in termini di variazioni di metabolismo e di escrezione azotata è stata correlata alle variazioni in una serie di parametri endogeni: livelli ematici e muscolari di ammonio-N, urea-N, nitrito-N, lattato, nonché i livelli dell'attività dell'arginasi muscolare, e, solo in pesce zebra, dell'attività muscolare di CPSasi III, OTCasi e ASS, enzimi del ciclo dell'urea. Anche in questo caso è stato valutato l'effetto dell'azione combinata dei due tipi di stress.

Tenendo conto del fatto che il nitrito non è solo un agente tossico (a concentrazioni millimolari), ma ha anche un ruolo fisiologico (a concentrazioni micromolari), intervenendo nell'omeostasi intracorporea  $\text{NO}_2^-$ -NO-Hb, la risposta all'ipossia funzionale indotta da nitrito è stata comparsa

con la risposta a bassi livelli di nitrito ambientale ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ) e alla sua combinazione con l'ipossia ambientale severa.

## 2. Introduzione

L'intrinseca relazione che unisce gli animali acquatici al mezzo in cui vivono è il risultato di un fine e complesso adattamento omeostatico, che ha portato, nel corso dell'evoluzione, allo sviluppo di complessi meccanismi funzionali metabolici, atti ad espletare le normali funzioni fisiologiche in un mezzo, quello acquoso, altamente dinamico e con il quale gli animali instaurano rapidi ed intensi scambi obbligati di materia ed energia (Harper e Wolf, 2009). Pertanto, un qualsiasi disturbo ambientale può rappresentare un potenziale fattore di stress.

I teleostei, presenti in circa 30.000 specie, occupano, sia in ambiente naturale che in cattività, habitat molto diversi tra loro, ed è proprio la loro ampia distribuzione che li ha portati ad essere dei potenziali e validi modelli per lo studio dei meccanismi funzionali messi in atto per rispondere alle variazioni ambientali.

Lo stress, definito alla fine degli anni 60 da Seyle (Seyle, 1936) come “una risposta non specifica ad una richiesta di cambiamento”, pur subendo negli anni diverse connotazioni, è riconosciuto come il meccanismo adattativo che consente all'organismo di affrontare le variazioni ambientali, mettendo in atto meccanismi metabolici e funzionali adeguati a garantirne la sopravvivenza.

Molte risposte da stress sono comuni anche tra differenti gruppi tassonomici, e nei pesci come in tutti gli altri vertebrati, lo stimolo esterno porta all'innescare di una serie di risposte che possono dividersi in :

risposta primaria: consiste nella stimolazione e nel rilascio di ormoni corticosteroidi e catecolammine con alterazione nei livelli dei neurotrasmettitori,

una risposta secondaria: caratterizzata da modificazioni nei processi metabolici, aumento dei livelli di glucosio, lattato e conseguente diminuzione di glicogeno, aumento dei livelli di sodio e cloro, i principali ioni responsabili dei processi di osmoregolazione alterazione nelle difese immunitarie.

una risposta terziaria: consiste in una serie di cambiamenti che interessano l'intero animale che alterano e compromettono la crescita, il nuoto, modificando anche il pattern comportamentale (Barton et al., 2002).

La durata di esposizione ad un fattore stressogeno è importante nel determinare il livello di risposta da parte di un organismo: stress acuti (caratterizzati da una breve durata, ore ) e stress cronici (caratterizzati da una lunga durata, giorni o settimane) innescano risposte diverse. Mentre in letteratura sono molteplici gli studi riguardanti lo studio delle risposte funzionali su trattamenti cronici, relativamente poche sono le informazioni riguardanti gli stress acuti.

Lo studio della risposta da stress può avvalersi, come già accennato, di indicatori biochimici e molecolari, in grado di avvertire gli effetti di stressogeni chimici, fisici e biotici ai livelli più bassi dell'organizzazione biologica. Sebbene tali parametri siano molto sensibili e mostrino una rapida risposta, le informazioni che si ottengono sono puntiformi e non forniscono indicazioni sulle alterazioni che possono coinvolgere l'organismo, la popolazione, la comunità e l'intero ecosistema biologico. La conoscenza di una risposta da stress integrata, che spieghi cioè i meccanismi funzionali che modulano non solo la risposta cellulare, ma anche quella dei sistemi e dell'intero organismo può essere ricercata attraverso l'impiego dei cosiddetti indicatori di performance, parametri funzionali sintetici in grado di incorporare gli effetti dell'azione sinergica di processi complessi ai diversi livelli di organizzazione ed integrazione biologica (Marshall, 1990). Inoltre, i test di performance, cumulando le diverse risposte molecolari e biochimiche, possono essere utilizzati per valutare l'azione cumulativa o sinergica di più fattori stressanti, mostrando un'elevata rilevanza ecologica e tempi di risposta piuttosto brevi (Marshall, 1990, Shreck, 1990) (Fig. 2.1) Particolarmente diffusi sono i test di esercizio ed i test respirometrici (consumo di ossigeno, quale misura della velocità metabolica), con i quali sono misurate le variazioni di performance e di capacità metabolica dell'animale a fronte di diversi stressogeni (Schreck, 1990). Ancora poco utilizzato come parametro di performance, è l'escrezione azotata (principalmente ammonio ed urea), quale indice indiretto della velocità di degradazione, accumulo, ed escrezione dei cataboliti del metabolismo dell'azoto. Le proteine, soprattutto nei pesci carnivori, sono accumulate principalmente nel muscolo (Ip et al., 2001), e rappresentano la principale fonte energetica, piuttosto che i carboidrati ed i lipidi, come invece accade per i mammiferi (Kaushik e Seiliez, 2010, Moon e Johnston, 1981). L'escrezione azotata potrebbe essere particolarmente utile nello studio delle risposte da stress nei teleostei d'acqua dolce.

L'interesse della fisiologia ambientale verso i teleostei d'acqua dolce nasce dal fatto che proprio le acque dolci sono siti particolarmente sensibili allo stress ambientale (Paerl, 2004). Molti e diversi fattori e condizioni ambientali possono alterare lo stato funzionale degli animali acquatici, tra i quali troviamo la temperatura, (Fuiman e Batty, 1997; Beamish 1978; Wieser e Kaufmann 1998; Dickson et al., 2002; Koumoundouros et al., 2002), la salinità (Beamish, 1978; Brett, 1987), la concentrazione di ossigeno disciolto, (Beamish, 1978; Bickler e Buck, 2007; Boutlier e Pierre, 2000), gli inquinanti ambientali (quali ad es., ammonio, nitrito e nitrati) (Camargo e Alonso, 2006).

Qui di seguito verranno approfonditi alcuni aspetti fondamentali relativi a tali fattori ambientali e al loro potenziale ruolo di agenti stressogeni per i teleostei di acqua dolce. Successivamente saranno schematizzate le principali caratteristiche dell'escrezione azotata nei pesci e nei teleostei

in particolare, al fine di evidenziarne le potenzialità come parametro di performance per la valutazione dello stress ambientale.

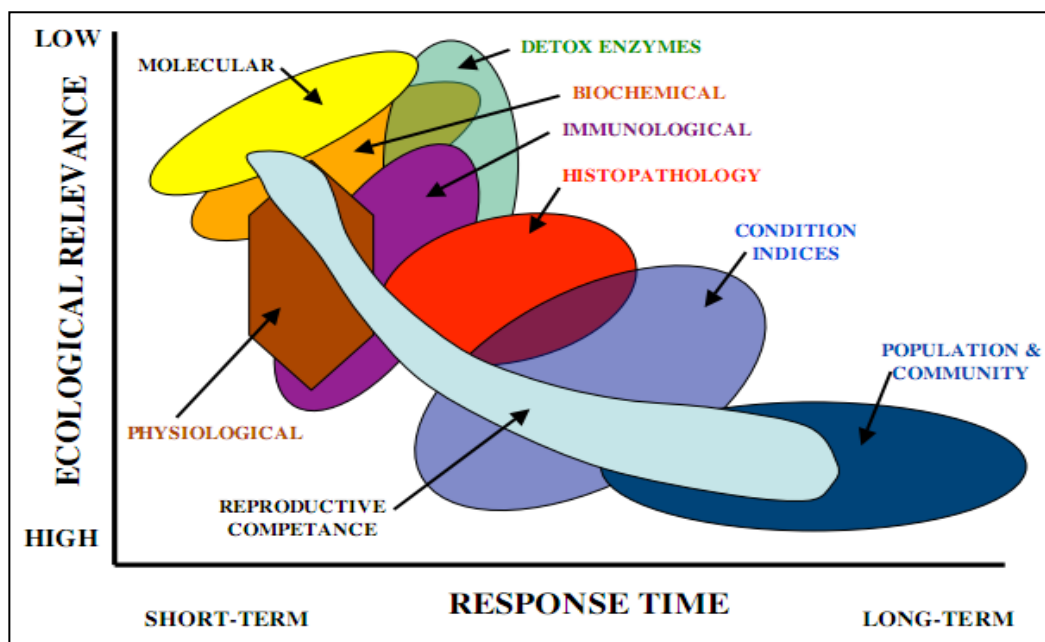


Figura 2.1 – Livelli delle risposte degli animali allo stress ambientale e loro rilevanza ecologica (da Adams, 1990, modificato).

## 2.1 Stress da variazioni di temperatura

I pesci sono animali pecilotermi e la temperatura dell'acqua è il maggior fattore che determina il tasso metabolico e la spesa energetica, in quanto variazioni nella temperatura dell'acqua hanno grandi effetti sul loro metabolismo standard.

E' noto che la temperatura è il fattore ambientale che maggiormente influenza l'energetica degli animali; infatti, poiché la velocità di tutte le reazioni chimiche, soprattutto di quelle enzimatiche, aumenta con la temperatura, l'attività metabolica di un animale è strettamente correlata alla temperatura corporea. Pertanto, il consumo di ossigeno tende ad aumentare o diminuire in parallelo all'aumento o diminuzione della temperatura ambientale (Hazel e Prosser, 1974). Alle alte temperature, la maggiore attività dei sistemi biologici porta ad un potenziamento nei processi di circolazione e ventilazione con un incremento nella domanda di ossigeno da parte di cellule e tessuti, tuttavia questa capacità di risposta ha un limite funzionale legato all'adattabilità di ciascuna specie ed alla propria temperatura di tolleranza. L'abbassamento della temperatura, dal lato opposto, porta ad una diminuzione del consumo di ossigeno per rallentamento e riduzione dei processi metabolici, con una minore produzione di ATP da parte dei mitocondri (Portner et al., 2004).

La tolleranza alle alte temperature, che si manifesta in alcuni pesci è il risultato della realizzazione di alcune strategie funzionali che gli consentono di assumere, anche in condizioni



in cui il contenuto di ossigeno è minore per la ridotta solubilità, ossigeno dall'acqua attraverso un aumento del tasso di ventilazione, della gittata cardiaca e/o un incremento dell'area epiteliale branchiale deputata agli scambi gassosi (Nillson, 2007, Farrell et al., 1980; Taylor e Barrett, 1985).

Clarke e Johnson (1999) hanno anche osservato una relazione curvilinea tra il tasso metabolico e la temperatura basata sull'analisi dei dati di 69 specie di pesci teleostei. Questo risultato era tuttavia in contrasto con quanto riportato in salmonidi (Cho e Kaushik, 1990) e altre specie sia d'acqua fredda (Kaushik, 1998) che d'acqua calda, come il pesce mandarino *Siniperca chuatsi* (Liu et al., 2000). Alla loro temperatura ottimale, il metabolismo standard di tali specie sembra essere simile (Kaushik, 1998; Médale e Guillaume, 1999).

Queste differenti conclusioni possono essere spiegate col fatto che le analisi di Clarke e Johnson (1999) sono basate sull'esame di dati pubblicati con una sola temperatura per specie, definita come "temperatura sperimentale più rappresentativa di quella vissuta allo stato selvatico". Usando quest'approccio, la relazione curvilinea, significativa, è la conseguenza soprattutto del basso tasso metabolico per le specie polari ( $< 5^{\circ}\text{C}$ ) e dell'alto tasso metabolico per specie di pesci tra  $35$  e  $40^{\circ}\text{C}$ . Numerosi studi con specie polari, temperate e tropicali hanno dimostrato, però, che non esiste una relazione univoca tra temperatura ambiente e tasso metabolico tra le specie (Médale e Guillaume, 1999).

## **2.1 Stress da variazioni di salinità**

Per la maggior parte degli animali il mantenimento di un bilancio idrico ragionevole è un problema abbastanza semplice da risolvere. Per gli animali marini, le cellule ed i fluidi corporei sono in equilibrio osmotico con il mezzo circostante. Tuttavia quando gli organismi viventi iniziarono a colonizzare habitat osmoticamente più difficili, come le coste, gli estuari, i fiumi e le terre emerse, il problema del bilancio idrico assunse un'importanza fondamentale. Infatti, quando una cellula è lontana dall'ambiente marino, va incontro ad una serie di problemi, in quanto l'acqua tende ad entrare nella cellula (da ambienti diluiti come le acque dolci) oppure a fuoriuscirne (come nell'aria secca delle zone terrestri), e nessuno dei due tipi di scambio idrico obbligatorio può rimanere senza correzioni, se la cellula deve rimanere in vita.

Delle specie di teleostei finora conosciute, il 95% è rappresentato da specie stenoaline che vivono esclusivamente in acque dolci o acque marine, la rimanente parte, il 5%, è costituito da specie eurialine che hanno la capacità di tollerare fluttuazioni più o meno improvvise di salinità (Evans, 1984).

Un numero elevato di animali acquatici si mantiene sempre iperosmotico (la maggior parte degli animali delle acque salmastre ed acque dolci) o iposmotico (la maggior parte dei vertebrati marini) rispetto al mezzo in cui vive (Freire et al., 2008). In entrambe le situazioni, parte della regolazione viene effettuata sulle superfici esterne, sia a livello di tegumento nel suo insieme, sia attraverso aree specializzate più permeabili, come le branchie e i reni, o tramite particolari ghiandole o appendici modificate.

Gli animali d'acqua dolce devono affrontare il problema determinante di vivere in un mezzo permanentemente diluito, in cui i livelli di sodio, potassio e calcio sono spesso inferiori a 1 mM. Il gradiente costante di concentrazione li porta a perdere ioni e ad acquistare acqua.

Tutti gli abitanti delle acque dolci e la maggior parte di quelli delle acque salmastre sono regolatori iperosmotici. L'osmolarità del sangue dei vertebrati d'acqua dolce è compresa tra 280–360 mOsm (Varsamos et al., 2005), mentre l'osmolarità dell'acqua in cui vivono è generalmente molto inferiore a 50 mOsm (Randall et al., 2002). Data la loro iperosmolarità rispetto all'acqua circostante, gli animali d'acqua dolce devono affrontare due generi di problemi osmoregolativi:

- Tendenza al rigonfiamento dovuto al movimento d'acqua verso l'interno del corpo, per seguire il gradiente osmotico.
- Tendenza ad una continua perdita di sali verso il mezzo esterno.

L'aumento o la diminuzione della salinità altera la funzionalità strutturale dell'epitelio branchiale, inducendo modificazioni tese, nelle specie tolleranti, ad un aumento nel numero e nelle dimensioni delle cellule del cloro, considerate le principali cellule coinvolte nei processi di osmoregolazione nei pesci d'acqua dolce (Nillson et al., 2007; Evans, 2005).

L'osmoregolazione ha un costo energetico che dipende dal gradiente osmotico tra sangue e ambiente e dal gradiente elettrochimico degli ioni. Dal momento che l'osmolarità del sangue dei pesci è ~30% dell'acqua di mare, i gradienti ed i costi dovrebbero essere maggiori nel caso di acqua di mare 100%, minimi per i pesci isosmotici e intermedi per i pesci d'acqua dolce (Nagibina, 1983; Morgan e Iwama, 1991).

La tolleranza degli animali a variazioni di salinità varia a seconda del tempo di esposizione; gli organismi di molte specie sopravvivono per periodi considerevoli, sebbene siano incapaci di mantenere un bilancio energetico positivo. Nel definire il limite di tolleranza è necessario considerare che vi è una considerevole variabilità di tutti gli altri fattori che interagiscono con la tolleranza alla salinità (l'assunzione di ossigeno e la variazione del bilancio acido-base, il bilancio dell'azoto, la tolleranza termica, il mantenimento della capacità di cibarsi, di muoversi, etc...), (Willmer, 2003). La tolleranza può essere molto diversa negli individui allo stato

giovanile; in particolare è stato osservato un graduale cambiamento nella tolleranza alle salinità estreme durante lo sviluppo post-embrionale, segnando il livello limite di tolleranza nel passaggio dallo stadio giovanile a quello di adulti (Holliday e Blaxter, 1960; Holliday, 1969). Differenti studi hanno mostrato che la capacità di tolleranza alla salinità è età dipendente (*Alosa sapidissima*: Zydlewski e McCormick, 2001) o taglia dipendente (salmoni: Parry, 1958; Farmer et al., 1978; McCormick e Naiman, 1984; *Mugil cephalus*: Nordlie et al., 1982; tilapia, *Oreochromis aureus* e *Oreochromis niloticus*: Watanabe et al., 1985).

Ci sono relativamente pochi teleostei in grado di tollerare ampie oscillazioni di salinità, una di questi è gambusia, *Gambusia affinis*, appartenente alla famiglia dei Poeciliidae, che comprende specie che vivono in ambienti a salinità molto variabile (da 0 a ~ 40‰, Nordlie, 1996; Chervinski, 1983; Pyke, 2005).

### **2.3 Stress da variazioni di ossigeno disciolto**

La disponibilità di ossigeno ambientale varia notevolmente nello spazio e nel tempo. In ambiente terrestre, il contenuto di ossigeno rappresenta il 20% circa dell'aria. In acqua il contenuto di ossigeno è molto più variabile perché fortemente dipendente da altri fattori ambientali naturali o artificiali (temperatura, salinità, fenomeni di termocline o aloclino, eccesso di nutrienti, sostanze organiche provenienti da processi di lavorazione industriali o agricoli) (Rosenberg et al., 1991). La quantità di ossigeno nell'acqua di mare varia tra 0 - 8.5 ml l<sup>-1</sup> e non è uniformemente distribuita, lo strato superficiale è saturo di ossigeno mentre quello più profondo può incorrere in forti riduzioni di ossigeno.

L'ipossia ambientale è definita come quella condizione che si instaura quando la concentrazione di ossigeno disciolto in acqua scende al di sotto di 2 mg l<sup>-1</sup>, quando invece cade al di sotto di 1 mg l<sup>-1</sup> si passa ad una condizione di anossia (Diaz, 2001, Pearl, 2004).

Sia l'ipossia che l'anossia possono indurre gravi danni agli animali acquatici sia a livello cellulare che di intero organismo (Nikinmaa, 2002).

I pesci sono continuamente esposti a diminuzioni dei livelli di ossigeno ambientale e l'abilità di sopravvivere a queste condizioni varia in funzione delle specie; I teleostei, tuttavia, sono in grado entro certi limiti di reagire allo stress ipossico con risposte funzionali di vario genere che consentono di garantire la disponibilità di ossigeno a cellule e tessuti, mettendo in atto risposte tese a mantenere costante l'apporto di ossigeno a fronte della sua diminuzione ambientale, oppure riducendo e ridistribuendo il fabbisogno energetico. Tre strategie fondamentali possono essere messe in atto:

- aumento dell'efficienza di captazione dell'ossigeno;

- riduzione il metabolismo;
- utilizzo di vie anaerobiche.

La depressione metabolica da stress ipossico è ben documentata (Nilsson e Renshaw, 2004). La capacità di ridurre il tasso metabolico a livelli minimi, rappresenta una delle più comuni strategie di adattamento dei teleostei tolleranti all'ipossia (Bickler e Buck, 2007). Animali come la crucian carp (*Carassius carassius*) e carassio dorato (*Carassius auratus*) sono capaci di ridurre, in condizioni di anossia o ipossia il loro tasso metabolico del 70 - 95% (Van Waverveld et al., 1989, Jackson, 1968). Questa depressione che si verifica a livello dell'intero animale, è accompagnata da una riduzione tessuto – specifica della sintesi delle proteine del 50% in crucian carp (Smith et al., 1996) e dal 70 – 90% in tartarughe d'acqua dolce (Fraser, 2001).

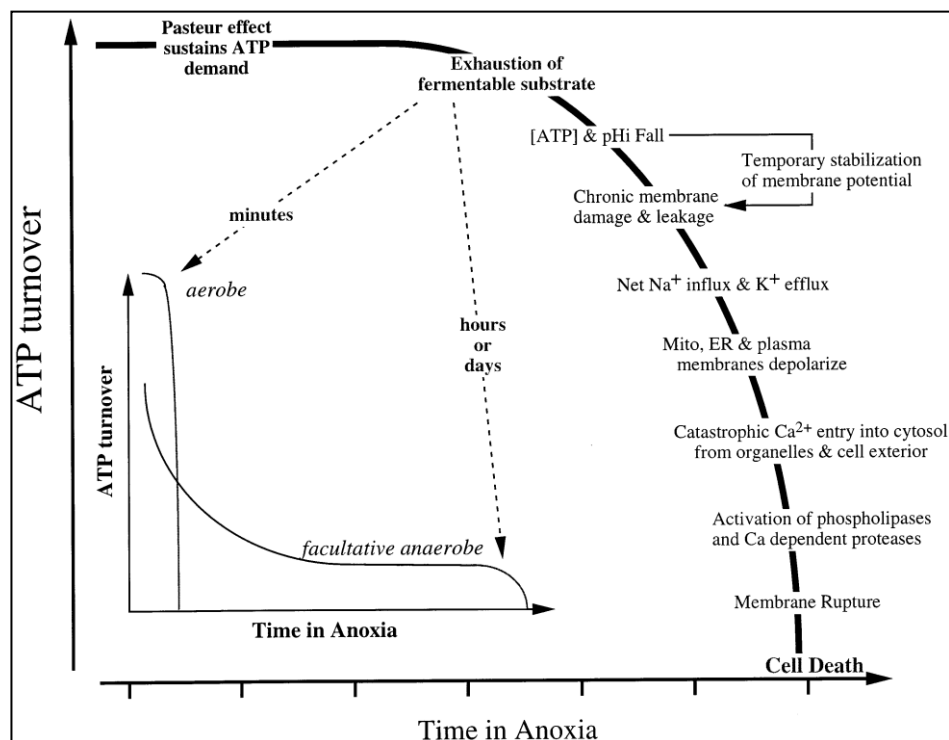


Figura 2.2- Processi a cascata che si instaurano in condizioni di stress ipossico prolungato o stato di anossia (da Boutillier and Pierre, 2000, modificato)

Quando la produzione di ATP derivante dalla fosforilazione ossidativa comincia a diminuire in seguito alla limitata disponibilità di O<sub>2</sub>, la domanda cellulare di ATP della maggior parte delle cellule e dei tessuti dei mammiferi tende a rimanere costante, portando ad un deficit energetico a cui è possibile rimediare con l'attivazione delle vie metaboliche anaerobiche di produzione di ATP. La produzione anaerobica di ATP può solo temporaneamente sostenere la domanda di ATP dei vari processi metabolici cellulari, in quanto le riserve di substrati fermentabili sono limitate e l'accumulo di prodotti finali deleteri aumenta nel tempo, innescando una serie di eventi a cascata che portano a danni da sbilancio ionico, con conseguente attivazione di enzimi fosfolipasi che degradano le membrane cellulari, con danno irreversibile e conseguente morte

dell'organismo Fig. 2.2. Pertanto, il passaggio al metabolismo anaerobico non può rappresentare una soluzione al problema della resistenza o dell'adattamento all'ipossia a lungo termine. Un modo per prevenire gli effetti letali di un metabolismo compromesso è quello di abbassare la domanda energetica di uno o più dei maggiori processi metabolici ATP-dipendenti e controbilanciare così una proporzionale e simultanea diminuita produzione di ATP (depressione metabolica). Questa è esattamente la strategia impiegata dalla maggior parte delle specie di vertebrati tolleranti l'ipossia, tra cui molti teleostei. Una caratteristica di questa tolleranza è, infatti, un'insolita capacità di entrare rapidamente e reversibilmente in depressione metabolica. Così, al contrario della risposta dei mammiferi alla mancanza di O<sub>2</sub>, i vertebrati “anaerobi facoltativi” usano il metabolismo anaerobio non per mantenere i tassi di produzione di ATP preesistenti, ma per sostenere tassi di turnover energetico ridotto in condizioni di ipossia. L'effetto netto di questo bilancio domanda-produzione di ATP è il consumo ridotto di substrato fermentabile (glicogeno) e il minor accumulo di prodotti metabolici dannosi, così da estendere il tempo di sopravvivenza.

In base alle risposte metaboliche che gli organismi sono in grado di innescare si possono evidenziare tre differenti livelli di ipossia (da notare che i limiti di saturazione indicati sono generici e possono variare da specie a specie):

*Ipossia lieve* (tra normossia ed il 40% circa di saturazione con aria) in cui non si osservano effetti importanti sul metabolismo; ad es., si è visto che nel sangue il glucosio 6 fosfato (G6P) aumenta significativamente in sogliola, *Solea solea*, esposta per 12h trattamento ipossico (40-60% di saturazione dell'aria), con un aumento della concentrazione di lattato al 59% rispetto ai valori di controllo in normossia (Dalla Via et al., 1994).

*Ipossia moderata* (20 – 30% di saturazione con aria) in cui si verificano effetti metabolici transitori; ad es., in *Solea solea* si ha un aumento di glucosio nel sangue e nel muscolo ed una diminuzione di ATP nel sangue seguito da un aumento del pH intracellulare (Dalla Via et al., 1994).

*Ipossia severa*: (<20 di saturazione con aria) è caratterizzata dall'attivazione del metabolismo anaerobico con un forte incremento dei livelli di lattato. In sogliola il lattato risulta più alto nel sangue che nel muscolo (Dalla Via et al., 1994). In trota iridea si osserva un aumento dell'estrazione di ossigeno attraverso l'attivazione di meccanismi neuronali e ormonali (Fritsche e Nilsson, 1993). La glicolisi anaerobica è stimolata dall'aumento di lattato nel sangue (Dunn e Hochachka, 1986), portando ad uno shift di preferenza di substrati metabolici da lipidi a carboidrati e proteine (Van den Thillart, 1982).

La capacità di ridurre il tasso metabolico a livelli minimi comporta diminuzione della sintesi proteica (che di norma utilizza una frazione dell'ATP totale pari al 20-30%), nella diminuzione della gluconeogenesi e in una minore attività delle pompe ioniche (Bickler e Buck, 2007).

Lo stress ipossico cronico può indurre l'attivazione di un fattore molecolare, denominato fattore inducibile da ipossia (HIF), che attiva la trascrizione di diversi enzimi glicolitici, quali esochinasi, lattato deidrogenasi (Okino et al., 1998), le enolasi per stimolare la glicolisi e la cattura del glucosio (Semenza et al., 1994; 1996). Nei pesci è anche responsabile dell'attivazione della trascrizione del gene per l'eritropoietina (Guillemin e Krasnow, 1997).

Tra le altre strategie di adattamento uniche riscontrate nei teleostei è anche l'estrema tolleranza all'ipossia cronica dimostrata nel cuore di ciclidi e di pesce zebra (*Danio rerio*) (Marques et al., 2008): al contrario dei mammiferi, in cui l'esposizione cronica del cuore ad ipossia porta ad apoptosi e perdita di miociti cardiaci, il cuore del pesce zebra presenta un'aumentata densità di miociti cardiaci. Nei mammiferi, la compensazione per la perdita di miociti si ha con l'ipertrofia dei rimanenti miociti (anche se in qualche caso interviene la rigenerazione del miocardio mediante proliferazione). Recentemente è stato dimostrato che il cuore del pesce zebra ha l'abilità di recuperare da danni meccanici cardiaci mediante proliferazione dei miociti: si può ipotizzare che, se il cuore risponde all'ipossia nello stesso modo in cui risponde ad un danno meccanico, possa prevenire l'apoptosi dei miociti cardiaci, e, evitando l'ipertrofia, mantenere normali le distanze di diffusione per l'ossigeno e impedire la formazione di centri anossici.

Molto interessante è l'uso dell'etanolo come prodotto anaerobico finale nel carassio dorato (*Carassius auratus*) (Nilsson, 2001). Negli epatociti del carassio, i gradienti ionici e, pertanto, le funzioni metaboliche come la conversione del lattato in etanolo, sono mantenute durante l'anossia (Bickler e Buck, 2007). L'etanolo può essere eliminato mediante diffusione attraverso le branchie, evitando il graduale, ma inevitabile, carico di protoni associati all'accumulo di acido lattico nei lunghi periodi di limitata o assente disponibilità di ossigeno.

In questa specie, come anche in carpa, in condizioni di ipossia si attiva nei muscoli una forma inusuale dell'enzima alcol deidrogenasi (LDH), che favorisce la formazione di etanolo a livello dei tessuti. I muscoli quindi trasformano l'acido lattico, che proviene in parte anche da altri tessuti, in etanolo ed anidride carbonica. In carassio dorato, infatti, l'alta capacità di sopravvivenza sembra essere dovuta ad una modifica nel metabolismo caratterizzata dalla produzione anaerobica di CO<sub>2</sub> ed etanolo (Van de Thillart, 1982) indipendente dalla disponibilità di ossigeno. L'etanolo si accumula principalmente nel muscolo rosso dove l'attività dell'enzima LDH è più elevata.

## **2.4 Stress da variazione di nitrito ambientale**

Lo ione nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) è un componente del ciclo dell'azoto, un ciclo peculiare in quanto è quasi completamente dipendente da organismi viventi, soprattutto batteri. Il nitrito è una sostanza a due facce (Jensen e Hansen, 2011) : a concentrazioni micromolari ha un ruolo funzionale, mentre a concentrazione dell'ordine delle mmol per litro ha un'azione tossicologica. Qui di seguito saranno descritti i principali fattori che possono determinarne un aumento in ambiente acquatico e principali caratteristiche di questo duplice ruolo negli animali acquatici.

### **2.4.1 L'azoto inorganico nell'ambiente acquatico: $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}_3^-$**

L'azoto è il quinto elemento più abbondante nell'universo, il 19° sulla crosta terrestre (di cui costituisce lo 0.03%), il primo elemento per abbondanza nell'aria (di cui costituisce il 78.09%), ed è il quarto elemento più abbondante della materia vivente (di cui costituisce il 3%), essendo uno dei componenti essenziali di molte biomolecole chiave nella vita degli organismi (amminoacidi, nucleotidi) (Campbell, 1990). Un aumento di disponibilità ambientale di azoto inorganico porta come prima conseguenza ad un aumento di abbondanza di produttori primari; tuttavia elevati livelli di azoto possono non essere metabolizzati dai sistemi ecologici con conseguenze deleterie sulla capacità di tolleranza degli animali.

L'ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), il nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ed il nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) sono le principali forme reattive disciolte di azoto inorganico presenti nell'ecosistema acquatico (Camargo e Alonso 2006; Wetzel, 2001). Questi ioni possono essere naturalmente presenti negli ecosistemi acquatici e derivare da processi deposizione atmosferica, deflussi di acque superficiale e sotterranee, dissoluzione di deposizioni geologiche ricche in azoto, processi di fissazione dell'azoto ad opera di organismi procarioti (cianobatteri) e degradazione di materiale organico. Fonti artificiali di azoto possono essere, invece, rappresentate da scarichi urbani ed industriali, reflui di allevamento o attività legate all'acquacoltura.

L'ammonio può essere ossidato a nitrato, in due step ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ), da batteri aerobici chemioautotrofi (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*), nel processo di nitrificazione, che è fortemente impedito a livelli di ossigeno ambientale  $< 1.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  (Sharma e Ahlert, 1977; Wetzel, 2001). Tale processo può essere influenzato anche da variazioni di pH, temperatura, numero di batteri nitrificanti, presenza di composti inibitori (acido nitroso, blu di metilene, antibiotici ed alcune sostanze organiche quali anilina e p-nitrobenzaldeide) (Russo e Thurston, 1991).

$\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  possono comunque essere rimossi dall'acqua ad opera di macrofiti, alghe e batteri che li utilizzano come fonte di azoto (Smith, 2003). Inoltre, in condizioni anaerobiche o in

sedimenti anossici i batteri facoltativi anaerobici possono utilizzare nitrito e nitrato come accettori finali di elettroni e portare alla formazione di  $N_2O$  e  $N_2$  (Paerl et al., 2002).

Nel corso degli ultimi due secoli, e particolarmente durante gli ultimi cinque decenni, le attività umane hanno fortemente alterato il naturale equilibrio del ciclo dell'azoto Fig. 2.3 con effetti tossici acuti e/o cronici sugli organismi sugli organismi acquatici (Camargo e Alonso, 2006), che si possono manifestare in una riduzione della capacità di sopravvivenza, alterazioni di crescita, limiti nella riproduzione (Russo, 1985; Lewis e Morris, 1986; Eddy e Williams, 1987; Philips et al., 2002; Constable et al., 2003; Jensen, 2003).

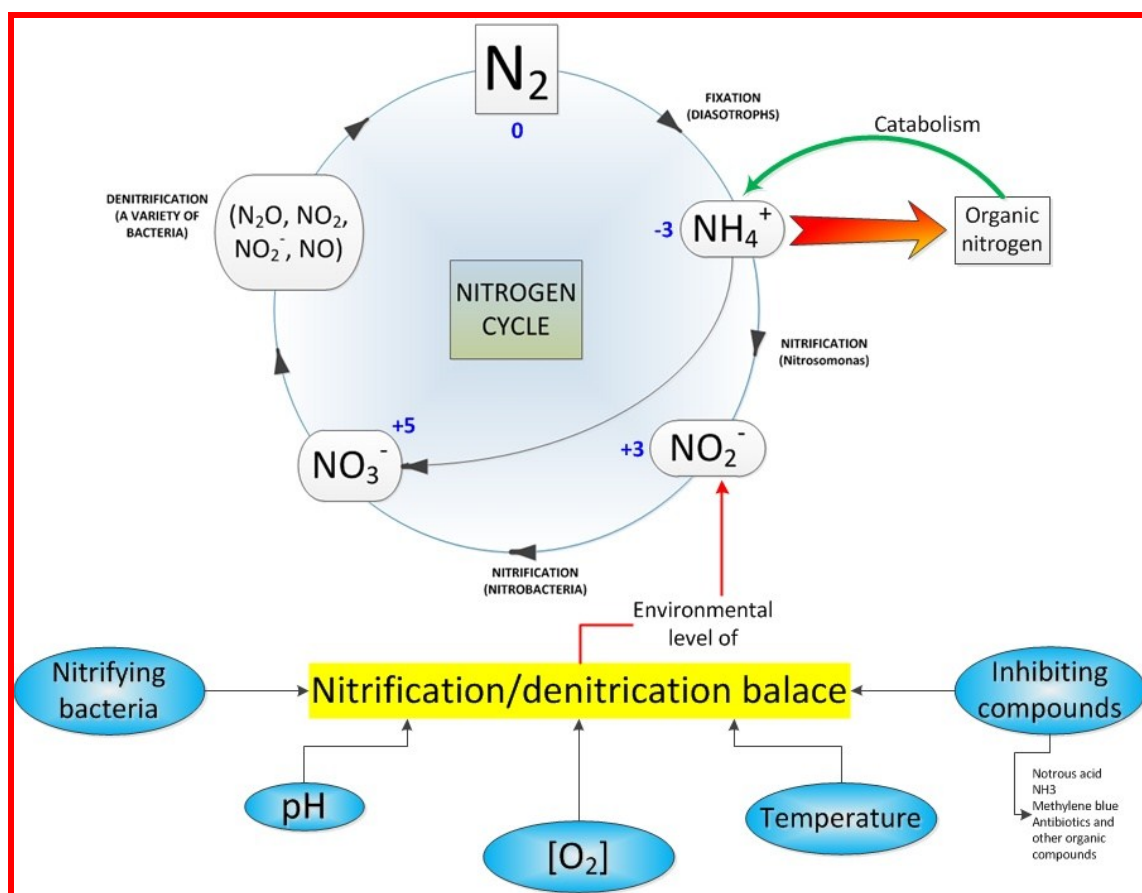


Figura 2.3 - Ciclo dell'azoto e fattori che possono alterare il bilancio nitrificazione/denitrificazione.

In acqua la forma ionizzata ( $NH_4^+$ ) e la forma non ionizzata ( $NH_3$ ) sono connesse attraverso il seguente equilibrio chimico



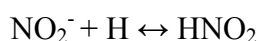
Le concentrazioni relative di  $NH_4^+$  e  $NH_3$  dipendono sia dal pH che dalla temperatura dell'acqua. All'aumentare della temperatura e del pH, la concentrazione di  $NH_3$  aumenta mentre quella di  $NH_4^+$  diminuisce.



La forma non ionizzata di ammonio è particolarmente tossica per i pesci, mentre la forma ionizzata è non tossica o discretamente tossica (Russo, 1985). L'azione tossica dell' $\text{NH}_4^+$  è associata a più effetti singoli o combinati che possono manifestarsi (I) con danni all'epitelio branchiale causando asfissia; (II) stimolazione della glicolisi e soppressione del ciclo di Krebs con conseguente acidosi e riduzione della capacità di legare l'ossigeno; (III) repressione del sistema immunitario; (IV) disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, con inibizione di produzione di ATP (Augspurger et al., 2003).

In ambiente acquatico i livelli di nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) sono normalmente molto bassi (al di sotto di 1  $\mu\text{M}$ ).

In acqua lo ione nitrito e l'acido nitroso non ionizzato ( $\text{HNO}_2$ ) sono collegati da uno stretto equilibrio chimico



Le concentrazioni relative di  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{HNO}_2$  dipendono dal pH dell'acqua; infatti, se il valore del pH tende ad aumentare, la concentrazione di  $\text{NO}_2^-$  può aumentare ed di conseguenza diminuire quella di  $\text{HNO}_2$ . La concentrazione di  $\text{HNO}_2$  è di 4-5 ordini di grandezza minore rispetto alla concentrazione di  $\text{NO}_2^-$  a pH 7.5-8.5 (Russo et al., 1981). Delle due forme, l'acido nitroso è quello meno presente nell'ambiente acquatico dal momento che solo una piccola frazione di nitrito si può presentare in questa forma a valori di pH normali ( $\text{pK}_a$  per  $\text{HNO}_2$  è  $\sim 3.3$ ). Pertanto è principalmente il nitrito che può causare tossicità in ambiente acquatico, con danni gravi agli organismi acquatici ed elevate mortalità (Svobodova et al., 2005a).

Lo ione nitrato, in ambiente acquatico, non presenta forme non ionizzate ( $\text{HNO}_3$  in acqua è completamente dissociato in  $\text{H}^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ). La principale azione tossica del nitrato, soprattutto su pesci e gamberi, si esplica nella sua azione di convertire il pigmento che trasporta l'ossigeno (emoglobina o emocianina) in una forma incapace di legare l'ossigeno (metaemoglobina o metemocianina) (Jensen, 1996; Scott e Crunkilton, 2000). Il nitrato, per esplicare questa azione tossica, deve essere convertito in nitrito all'interno del corpo dell'animale (Cheng e Chen, 2002). Il nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) risulta essere poco tossico per i pesci a causa della sua bassa permeabilità a livello dell'epitelio branchiale (Jensen, 1996; Scott and Crunkilton, 2000; Cheng e Chen, 2002; Alonso and Camargo, 2003). Per questo motivo la tossicità del nitrato negli ecosistemi acquatici è considerata irrilevante (Camargo et al., 2005).

## 2.4.2 Assunzione nitrito nei teleostei d'acqua dolce

I pesci d'acqua dolce necessitano di una continua assunzione di ioni per compensare le perdite passive legate al bilancio osmotico (Perry et al., 1984; Boisen et al., 2003).

Le conoscenze attuali sui meccanismi che regolano il trasporto ionico possono essere chiarite dallo schema riportato in Fig. 2.4.

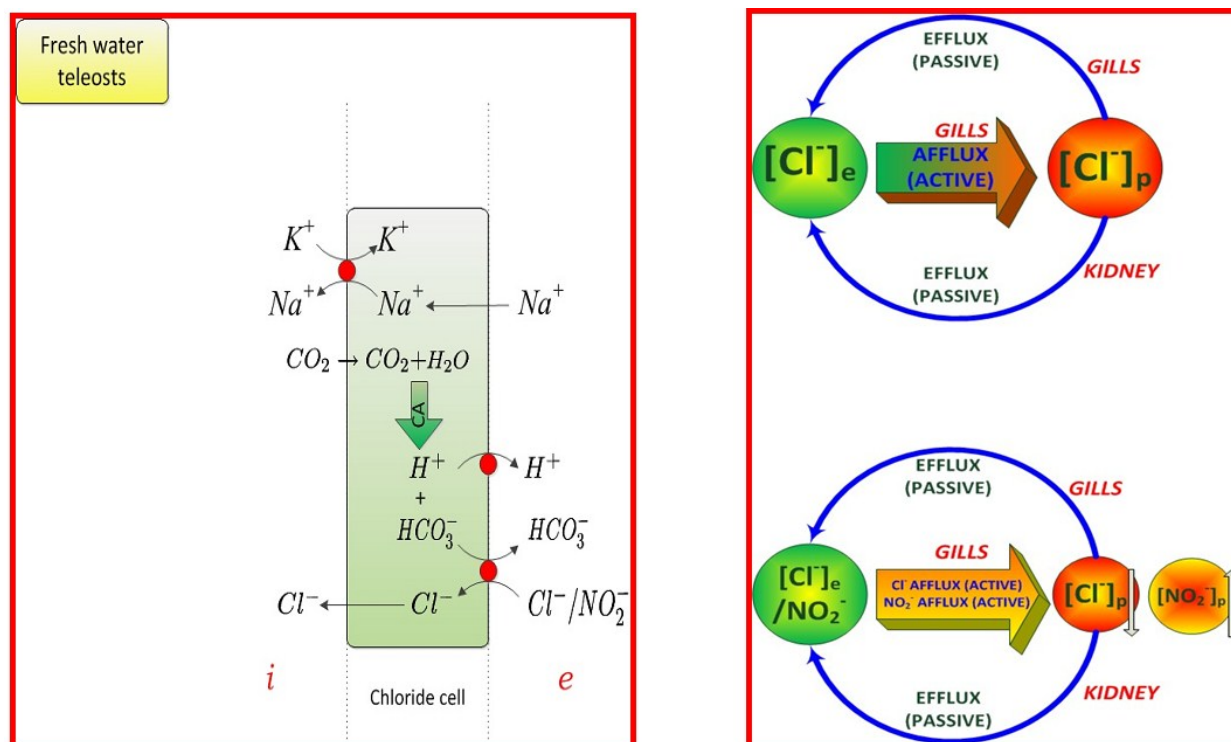


Figura 2.4 – Meccanismo di trasporto di NaCl a livello delle cellule del cloruro e competizione con lo ione nitrito.

Nelle branchie a livello delle cellule del cloruro una pompa protonica, localizzata a livello della membrana apicale, crea la forza che porta all'assunzione di  $Na^+$  attraverso i canali del sodio (Perry, 1997; Marshall, 2002; Evans et al., 2005), scambiato con i protoni provenienti dall'idratazione dell'anidride carbonica (catalizzata dall'anidrasi carbonica epiteliale); il bicarbonato formatosi viene utilizzato come contro-ione per l'assunzione del cloro attraverso uno scambiatore anionico. L'elevata affinità del nitrito per questo scambiatore comporta, in seguito ad aumento nei livelli di nitrito ambientale, uno shift nel meccanismo di assunzione dal cloro al nitrito, generando un accumulo di nitrito nel corpo dell'animale; la concentrazione ematica di nitrito in queste condizioni può raggiungere livelli che possono superare le concentrazioni ambientali (Jensen, 2007; Margiocco et al., 1983; Jensen et al., 1987).

Diversi studi (Crawford e Allen, 1977; Bath e Eddy, 1980) riportano che il nitrito ambientale è attivamente trasportato nel sangue a livello dell'epitelio branchiale attraverso la via di assunzione del cloruro e che l'assunzione del nitrito potrebbe essere inibita da un aumento

ambientale nel rapporto  $\text{Cl}^-:\text{NO}_2^-$ . La difficoltà di capire il meccanismo di assunzione del nitrito è stata sempre legata all'osservazione di alcune specie delle famiglie di Centachidi e Moronidi che non concentrano tale ione nel sangue; e che variazioni nei livelli ambientali di cloro non hanno effetti sui livelli ematici di nitrito e sulla sua tossicità in queste specie (Palachek e Tomasso, 1984; Mazik et al., 1991). Questa diversità è stata spiegata sia con l'esistenza di altre vie di assunzione del cloruro, che in base ai bassi tassi di assunzione di cloro a livello dell'epitelio branchiale (Williams e Eddy, 1986).

Diversi dati sperimentali (Williams e Eddy, 1986; Harris e Coley, 1991; Jensen et al., 2000) sui flussi in entrata di  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{Cl}^-$  hanno mostrato che il trasporto di questi ioni ha una cinetica di saturazione e che il nitrito è un inibitore competitivo per l'assunzione di cloruro e viceversa. Questo spiega anche perché un aumento nella concentrazione di cloruro può proteggere l'organismo dall'assorbimento di nitrito (Bath e Eddy, 1980) e dai suoi effetti tossici (Perrone e Meade, 1977). Ulteriori conferme vengono, sia, dal fatto che specie con elevati tassi di assunzione branchiale di cloruro (trota iridea, pesce persico, luccio) sono più sensibili al nitrito rispetto a specie con tassi più bassi (anguilla, carpa, tinca), (Williams e Eddy, 1986) sia dal fatto che l'ipercapnia ambientale (aumento di  $\text{CO}_2$ ) che porta ad una diminuzione nei livelli di assunzione di cloruro a livello branchiale, riduce anche l'assunzione di nitrito (Jensen et al., 2000).

Anche in specie con elevati tassi di assunzione branchiale di nitrito (crayfish e trota) possono manifestarsi delle differenze nell'accumulo, legate a variabilità specifiche. Stormer et al. (1996) illustrano come la trota iridea può essere divisa in due gruppi distinti, un gruppo molto sensibile al nitrito, che accumula nitrito rapidamente ed un gruppo tollerante. Le cellule del cloruro sono i siti di assunzione di cloruro e di nitrito, pertanto, una spiegazione circa il diverso accumulo potrebbe essere legato ad una differenza nel numero o nell'area superficiale delle cellule stesse (Kroupova et al., 2008; Perry et al., 1992) oppure ad una diversa proliferazione delle cellule del cloruro durante il trattamento con il nitrito nei diversi individui (Gaino et al., 1984; Williams e Eddy 1988).

### **2.4.3 Assunzione nitrito nei teleostei di acqua di mare**

In acqua di mare il nitrito è meno tossico, sia per l'elevato contenuto di cloro sia per il diverso meccanismo osmotico coinvolto nel bilancio ionico. I teleostei d'acqua di mare devono continuamente espellere ioni attraverso l'epitelio branchiale (Evans et al., 1999). In questi animali l'assunzione del nitrito avviene soprattutto a livello dell'epitelio intestinale. Grossel e

Jensen, (2000) hanno riportato che nell'European flounder la concentrazione di nitrito nel tratto intestinale è paragonabile a quella dell'ambiente esterno. Il trasporto è inibito dalla presenza di bumetanide, suggerendo che una parte dell'assunzione è mediata attraverso il cotrasportatore  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ , che è coinvolto nell'assunzione degli ioni a livello dell'epitelio intestinale.

#### 2.4.4 Il nitrito: ruolo fisiologico

Negli anni l'interesse scientifico si è rivolto soprattutto allo studio degli effetti negativi e tossicologici del nitrito, tralasciando la possibilità di un ruolo fisiologico di questo ione a basse concentrazioni. Solo negli ultimi anni è emerso che il nitrito può avere degli effetti diretti o mediati su diversi meccanismi fisiologici, esplicando un ruolo di regolatore funzionale di tipo omeostatico, studiati soprattutto nei mammiferi (Gladwin et al., 2005). Mentre nei mammiferi la dieta rappresenta la principale fonte esterna di nitrito (per riduzione del nitrato, abbondante costituente di molti cibi e bevande, ad opera di batteri presenti nella cavità orale, nei pesci d'acqua dolce il nitrito può provenire sia dalla dieta che dall'assunzione branchiale (Fig. 2.5).

Il nitrito è presente in tutti i tessuti sia dei mammiferi che degli altri vertebrati, con livelli plasmatici nei mammiferi di  $\sim 0.2\text{--}0.5\ \mu\text{M}$ , che possono aumentare in seguito a processi di infiammazione o infezione. Sebbene non vi siano in letteratura studi sistematici sui livelli basali di nitrito nel plasma, nei teleostei d'acqua dolce i livelli plasmatici sono dell'ordine delle micromoli (in genere  $< 10\ \mu\text{M}$ ) (Stormer et al., 1996; Doblander e Lackner, 1997, Jensen, 2009; Jensen e Hansen, 2010). Questi valori, più alti rispetto ai mammiferi, riflettono il meccanismo aggiuntivo di assunzione di questo ione che interessa i teleostei d'acqua dolce (Jensen, 2003).

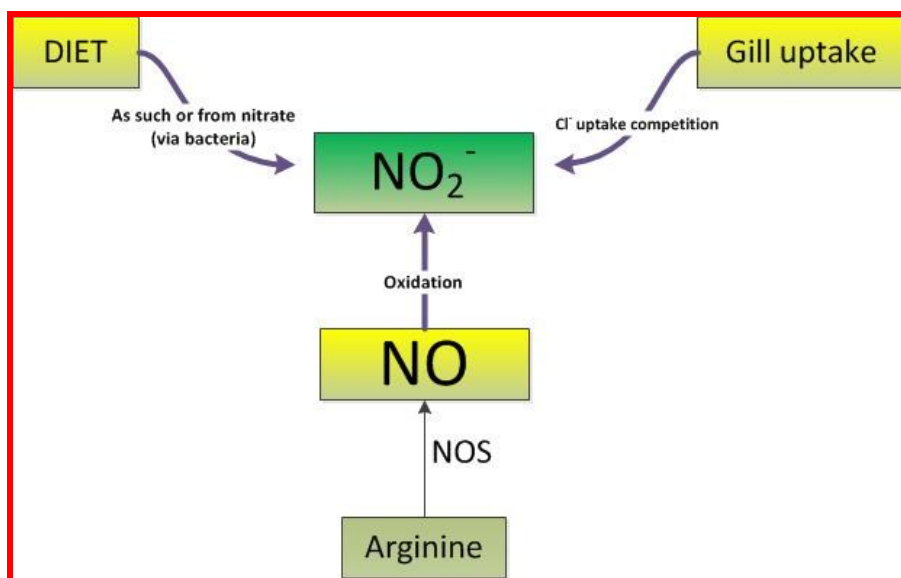
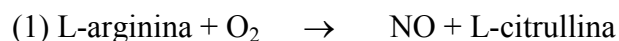


Figura 2.5 - Fonti di nitrito nei teleostei d'acqua dolce.

Il nitrito, che nell'animale si forma per riduzione dell'ossido nitrico (NO), era considerato una molecola relativamente inerte, fino a quando non si è dimostrato che a basse concentrazioni rappresenta una valida fonte di ossido nitrico (Cosby et al., 2003). La dimostrazione è venuta dal fatto che nei mammiferi è: i. presente nel plasma, negli eritrociti e nei tessuti; ii. è relativamente stabile (la sua reattività è 10.000 volte minore di quella dell'NO); iii. può essere convertito a NO dalla reazione con la deossiemoglobina.

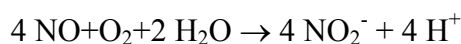
L'ossido nitrico è un radicale libero che funziona come un'importante molecola segnale che interviene nei processi di omeostasi cardiovascolare, neurotrasmissione e difesa immunitaria (Moncada e Higgs, 2006). L'NO è prodotto nell'endotelio dalla reazione dell'L-arginina con l'ossigeno, una reazione catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS), in un processo che richiede ossigeno e NADH (Alderton et al., 2001).



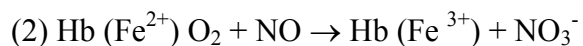
I mammiferi posseggono tre distinte isoforme di NOS: la forma endoteliale (eNOS), quella neuronale (nNOS) e la forma inducibile (iNOS) (Alderton et al., 2001). La maggior parte delle NOS sono inducibili, sebbene siano state descritte diverse isoforme specifiche di determinati organelli cellulari come la NOS mitocondriale (mtNOS) (Navarro e Boveris, 2008). NOS diverse sono state descritte in molluschi, insetti e crostacei (Palumbo, 2005), il cui ruolo non è stato ancora ben definito.

Nei pesci, è stata riscontrata e riconosciuta la presenza dell' eNOS ed il ruolo fisiologico nell'NO (Agnisola e Pellegrino, 2007; Tota et al., 2007).

Una volta prodotto, l' NO diffonde nel sangue dove reagisce con l'ossigeno a formare nitrito:



Inoltre può reagire con l'emoglobina ossigenata (Hb) formando metaemoglobina (metHb) e nitrato (Kim-Shapiro et al., 2006) e, per la sua forte affinità per il ferro del gruppo eme dell'emoglobina deossigenata, può formare nitrosilemoglobina (HbNO):

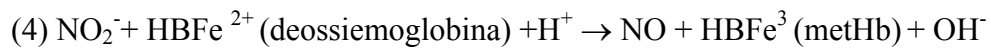


Queste due reazioni con l'emoglobina limitano la disponibilità di NO libero ed il suo ruolo e la sua azione come modulatore fisiologico (Fig. 2.6).

L'emivita dell'ossido nitrico varia tra 2ms a 2s e dipende principalmente dalla disponibilità di reagenti dell'ossido nitrico (Hill et al., 2010), e l'omeostasi di tale metabolita viene spesso testata dall'analisi dei metaboliti stabili dell'NO (Bryan e Grisham, 2007). In particolare, i livelli di

nitrito nel plasma son utilizzati come marker dell'attività delle NOS nei mammiferi (Kleinbongard et al., 2003).

L'NO può essere sintetizzato da nitrito (Fig. 2.7) attraverso sia processi di riduzione non enzimatici (Zweier et al., 1999), che da processi enzimatici ad opera della xantina ossido reduttasi, che a basse tensioni di ossigeno e pH riduce il nitrito ad NO (Millar et al., 1998), da enzimi mitocondriali (Castello et al., 2006) o dall'emoglobina deossigenata (Cosby et al., 2003), dalla mioglobina (Shiva et al., 2007) o dalla neuroglobina (Petersen et al., 2008), garantendo una rapida ed efficace produzione di ossido nitrico in condizioni di ipossia e/o di esercizio esaustivo. Particolare interesse è stato rivolto all'attività nitrito reduttasi della deossiemo globina (rappresentata nella reazione 4), che svolge un ruolo cardine nei processi di vasodilatazione



Questo processo si articolerebbe in diversi step: 1) il trasporto del nitrito attraverso le membrane dei globuli rossi; 2) la reazione del nitrito con l'emoglobina ossigenata; 3) la fuoriuscita dell'NO dai globuli rossi; e, 4) l'innesco del processo di vasodilatazione. Tuttavia, i meccanismi direttamente coinvolti restano ancora non del tutto chiari (Jensen, 2009).

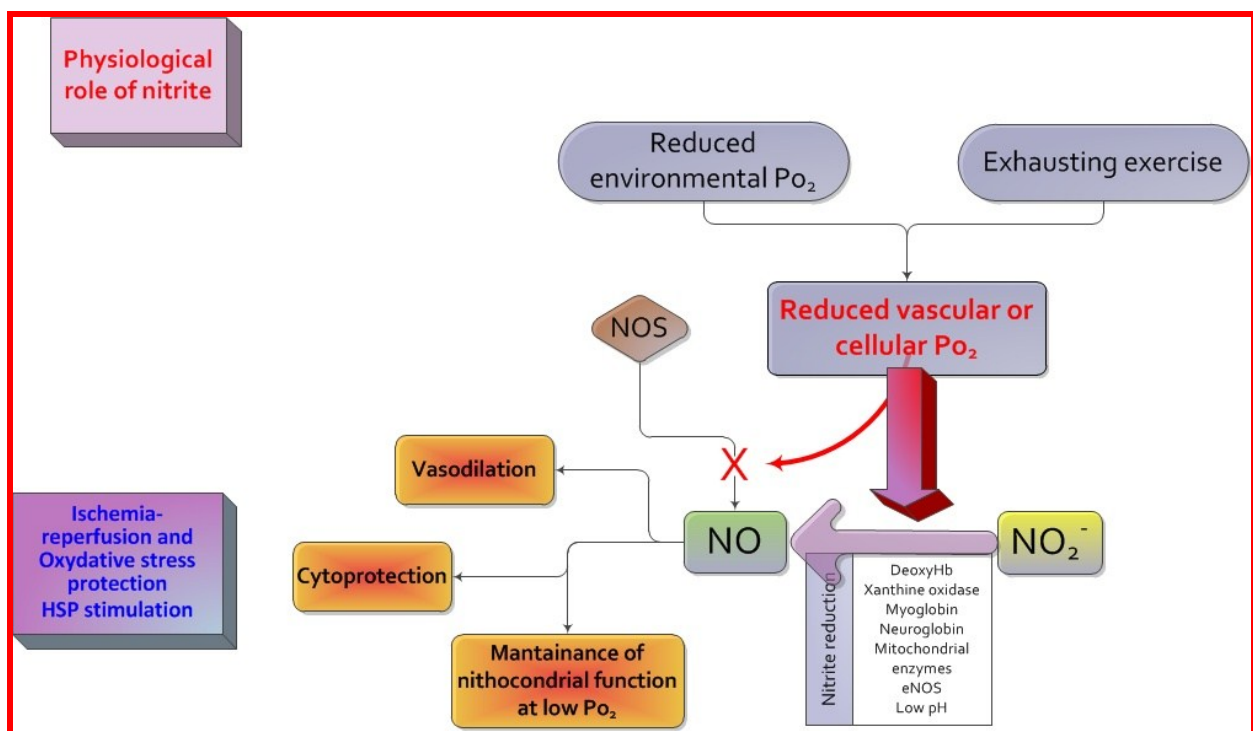


Figura 2.6 – Ruolo fisiologico del nitrito

La maggior parte dell'NO formato nella reazione 4 è catturato come ferro nitrosil-emoglobina ( $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO}$ ), che può essere impiegato come strumento per stabilire la concentrazione di NO nel sangue (vedi reazione 3).

I processi su citati sono particolarmente favoriti in condizioni di acidosi (abbassamento del pH cellulare) e bassa tensione di ossigeno ( $\text{PO}_2$ ). Nei mammiferi, si è visto che il nitrito interviene nei processi di vasodilatazione, e svolge un ruolo protettivo per le cellule in seguito ad ischemia/riperfusione mediando la produzione di NO (Shiva et al., 2007). Infatti, il nitrito in condizioni di ipossia, anossia o esercizio esaustivo, può essere rapidamente consumato a formare specie nitrosiliche o NO in un processo che è noto come “hypoxic buffer”, una situazione in cui viene sintetizzato NO in modo indipendente ed autonomo dall'ossigeno. La sintesi di NO da nitrito è, per alcuni teleostei d'acqua dolce tolleranti all'ipossia, probabilmente una strategia funzionale per proteggersi dalla carenza di ossigeno (Fig. 2.6).

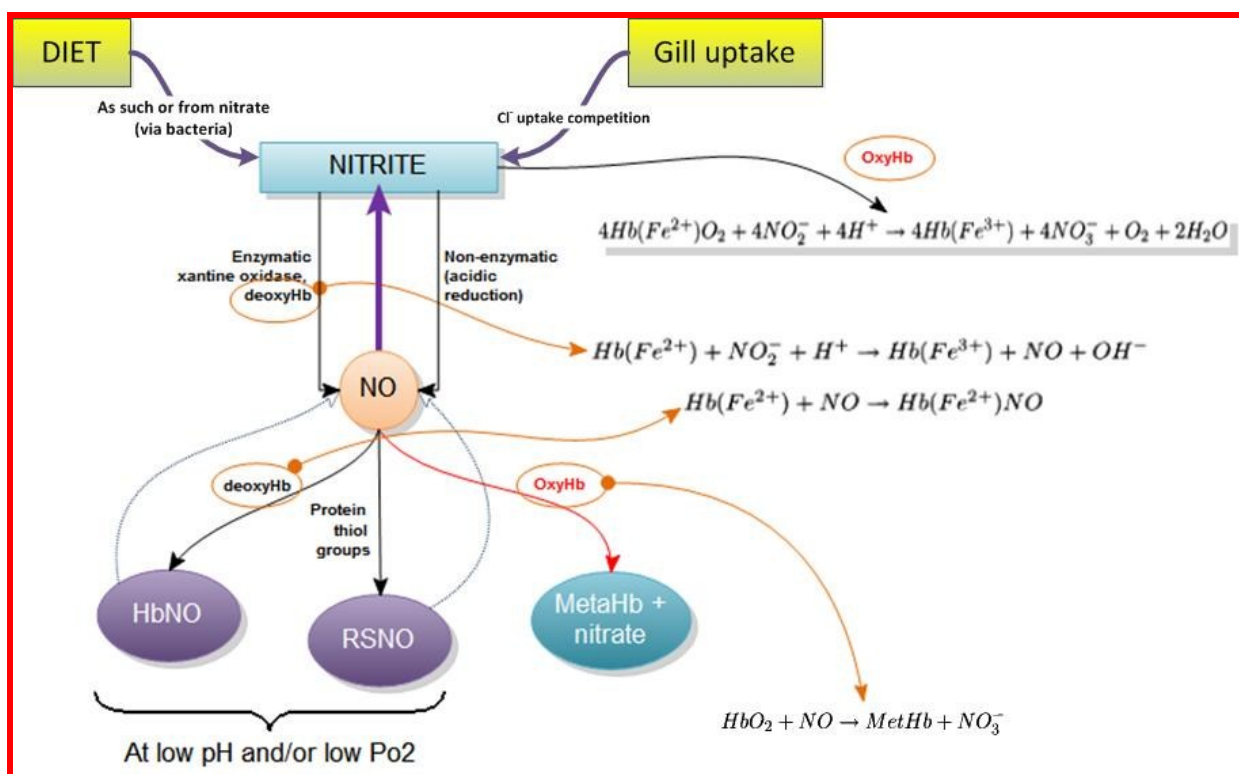


Figura 2.7 – Reazioni di sintesi e conversione dello ione nitrito

Normalmente durante l'ipossia, come osservato in ratti sottoposti per pochi minuti ad ipossia acuta, diminuisce la concentrazione di nitrito intracellulare ed aumenta la concentrazioni di composti FeNO e SNO (Feelisch et al., 2008); in carassio dorato durante il trattamento ipossico tutti i livelli intracellulari di nitrito e dei metaboliti dell'NO rimangono invariati suggerendo l'innescio di un sistema di controllo dell'NO, la capacità inoltre, in carassio dorato di mantenere

stabili i livelli dei composti SNO è il risultato di un sofisticato meccanismo adattativo (Hansen e Jensen, 2010). A tal riguardo, nei mammiferi Benamar et al., (2008) hanno confermato lo stretto legame NO-NO<sub>2</sub> in un modello sperimentale che descrive la capacità dei mitocondri di regolare i livelli di ossigeno in seguito ad un trattamento ipossico.

A bassi livelli di ossigeno, il nitrito, ridotto ad NO ad opera del complesso III della catena di trasporto degli elettroni, diffonde nella catena e si lega al sito attivo della citocromo ossidasi (COX), inibendo la riduzione dell'ossigeno ad acqua; in questo modo aumentano i livelli di ossigeno intracellulare e l'ossido nitrico, a questo punto, in presenza di ossigeno può essere riconvertito in nitrito.

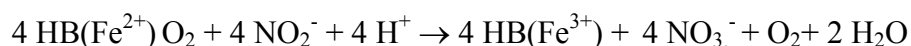
In definitiva, nei mammiferi, il nitrito è stato riconosciuto una fonte importante di NO, che in condizioni ipossiche può essere grado di innescare una risposta rapida ed immediata per rispondere ad una condizione stressogena, a cui possono seguire, processi di adattamento, modificazioni trascrizionali e geniche. Quanto questo meccanismo sia rilevante in altri vertebrati, e particolarmente nei teleostei, è ancora da stabilire.

#### **2.4.5 Il nitrito: tossicità e suoi effetti**

Elevate livelli di nitrito ambientale (mM) possono compromettere lo stato di salute dei pesci e causare mortalità (Svobodova et al., 2005; Kroupova et al., 2005). La tossicità del nitrito è essenzialmente legata alla concentrazione dei cloro nell'acqua, infatti diminuisce all'aumentare della concentrazione ambientale di cloro per i motivi illustrati in precedenza.

Per la loro fisiologia i teleostei d'acqua dolce possono accumulare nitrito nel sangue a concentrazioni 60 volte maggiori rispetto al mezzo esterno (Fontenot e Isely, 1999). Il nitrito può accumularsi anche in altri tessuti come fegato, branchie e muscolo (Margiocco et al., 1983); sebbene il sangue sembri essere il primo sito bersaglio.

Nel sangue il nitrito esplica la sua tossicità ossidando l'emoglobina (con Fe<sup>2+</sup>) a metaemoglobina (Fe<sup>3+</sup>), che non è più in grado di legare l'ossigeno (Kiese, 1974). La stechiometria della reazione è la seguente:



Nel sangue la metaemoglobina si forma spontaneamente, anche in assenza di nitrito, soprattutto per ossidazione dell'emoglobina; tuttavia, i livelli di metaemoglobina nei pesci non superano mai il 2.5% (Cameron, 1971), mentre nei mammiferi raramente raggiungono l'1% (Beuteler, 1968).

I pesci possono tollerare a riposo elevati livelli di metaemoglobina (> 70%) senza mostrare mortalità. Tuttavia, la diminuzione del contenuto arterioso di ossigeno può far ridurre la disponibilità di ossigeno ai tessuti. Smith e Williams (1974) riportano che in trota iridea il tasso



di mortalità non era correlato ai livelli di metaemoglobina nel sangue. Perrone e Meade (1997) affermano che alti livelli di metaemoglobina (89%) nel sangue non inducono mortalità nei pesci. Secondo Crawford e Allen (1977) non è la sola formazione di metaemoglobina ad indurre mortalità ma l'innescare di altri meccanismi funzionali. In pesce zebra il contenuto di metaemoglobina non supera il 10% in seguito a trattamento per 48h con nitrito 0.6mM, mentre si osserva un aumento del 59% quando gli animali sono trattati con nitrito 2mM senza osservare alcuna mortalità (Jensen, 2007). Questo aspetto è supportato dal fatto che vi sono molte specie che possono vivere per periodi più o meno lunghi a bassi livelli di emoglobina (Huertas et al. 2002). Tuttavia, la diminuzione del contenuto arterioso di ossigeno legata alla metaemoglobinemia può ridurre la disponibilità di ossigeno ai tessuti. L'ipossia funzionale generata dalla metaemoglobina comporta un aumento nei livelli di lattato nel sangue e nei tessuti (Jensen et al., 1987).

Livelli tossici di nitrito inducono alterazioni dei lisosomi e dei mitocondri del fegato riducendo la funzionalità di questi organelli (Arillo et al., 1984).

Il nitrito altera diverse funzioni fisiologiche (Fig. 2.8), che possono interessare i processi di: regolazione ionica, Gisbert et al. (2004) riportano che il nitrito ambientale porta ad un aumento nei livelli plasmatici di cloro e potassio legati in parte ad un'iperfunzionalità delle cellule del cloro (Margiocco et al., 1983; Gaino et al., 1984; Frances et al., 1998), dovuta all'elevato numero di cellule del cloro soggette ad ipertrofia (86% in pesci trattati con nitrito contro il 10% dei pesci di controllo) ed una concomitante perdita di  $K^+$  a  $Cl^-$  dalla muscolatura scheletrica (Knudsen e Jensen, 1997); questa eccessiva perdita di  $K^+$  induce nell'animale una severa ipercalcemia extracellulare (Jensen, 2003).

Sono anche riportate alterazioni:

- nei processi di ventilazione e respirazione, in carpa ed in trota iridea (la ventilazione aumenta per elevata  $PO_2$  arteriosa (diminuzione  $PCO_2$  arteriosa) (Jensen et al., 1987; Aggergaard e Jensen, 2001);
- nel sistema cardiovascolare, in trota iridea esposta a nitrito 1 mM si osserva un consistente aumento del tasso cardiaco, questo suggerito dal fatto che il nitrito induce vasodilatazione mediata dall'NO (Aggergaard e Jensen, 2001);
- nel sistema endocrino;
- nei meccanismi di escrezione.(Jensen, 2003).

In ultimo ed altrettanto interessante è l'effetto del nitrito sulla possibilità di formare ammine cancerogeniche e mutageniche: il nitrito può essere convertito ad  $HNO_2$  e successivamente a

$\text{N}_2\text{O}_3$ ; questi reagendo con composti azotati possono formare azoto-composti cancerogenici (Tilak et al., 2007) (Fig. 2.9)

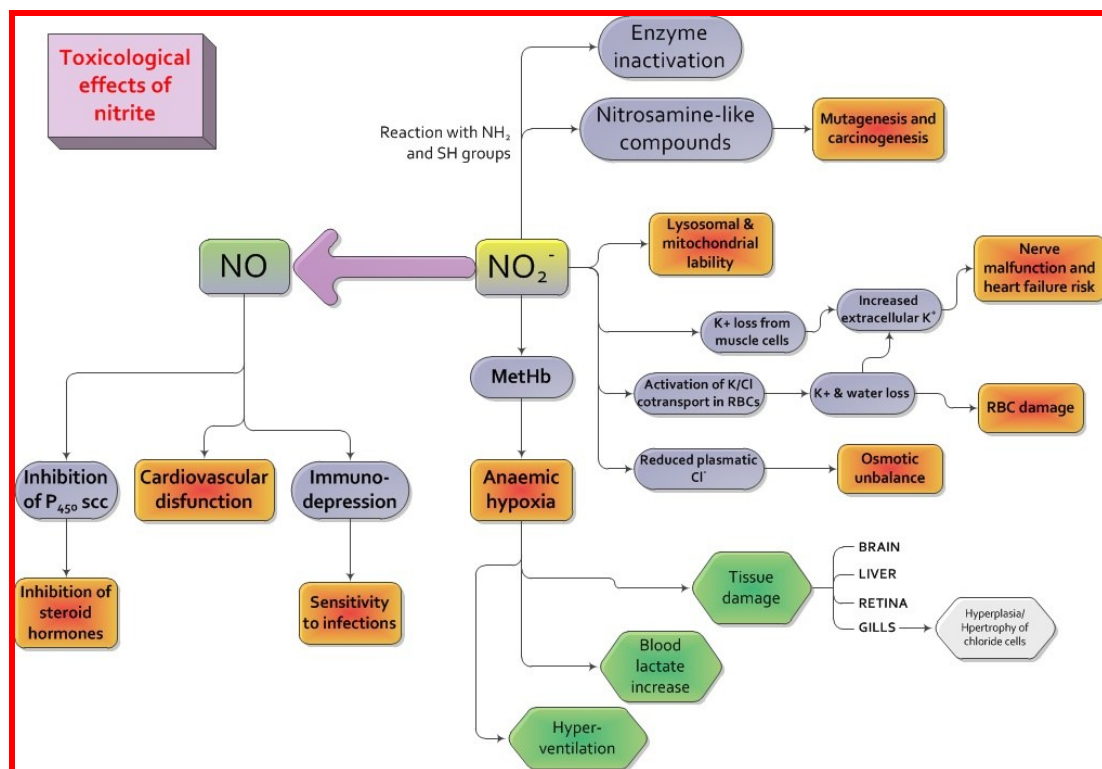


Figura 2.8 – Effetti tossicologici del nitrito ambientale

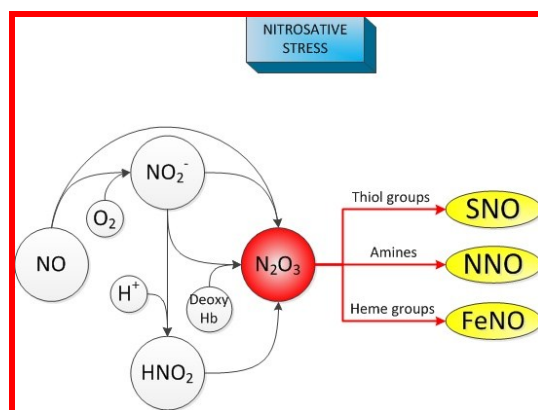


Figura 2.9 – Nitrito e suoi derivati

#### 2.4.6 Detossificazione da accumulo di nitrito

Gli animali acquatici sono in grado di convertire il nitrito in composti meno tossici attraverso diversi processi metabolici come riportato in diversi lavori sperimentali (Jensen, 1996; Doblander e Lackner, 1996; Stormer et al., 1996; Doblander e Lackner, 1997).

In gamberi esposti a nitrito, i nitrati nell'emolinfa raggiungono livelli di 35.4 mM segno di una conversione del nitrito a nitrato (Jensen, 1996). Anche nei pesci le concentrazioni extracellulari di nitrato aumentano a valori delle millimoli durante il trattamento con nitrito (Stormer et al., 1996; Doblander e Lackner, 1997).

Gli eritrociti sia dei pesci che dei mammiferi posseggono una metaemoglobina riduttasi in grado di convertire la metaemoglobina ad emoglobina (Cameron, 1971). Questo consente il rapido recupero (24 - 72h) dallo stress da nitrito (Huey et al., 1980). Nei pesci l'attività di quest'enzima può variare con la temperatura (Perrone e Meade, 1977). I pesci sono anche in grado di recuperare dal nitrito ossidandolo a nitrato, in reazioni in cui sono coinvolte l'emoglobina, la catalasi e la citocromo ossidasi (Doblander e Lackner, 1996). Interessante risulta anche la capacità degli eritrociti di convertire il nitrito a nitrato (Doblander e Lakner, 1997), che può essere facilmente espulso attraverso le urine e la bile.

#### **2.4.7 Effetto del nitrito sull'escrezione azotata**

Le informazioni riguardanti l'effetto del nitrito ambientale sull'escrezione azotata sono piuttosto scarse ed alquanto diverse. Un aumento nell'escrezione di ammonio ed urea è stata osservata in gamberi marini in seguito a trattamento con nitrito (Chen e Cheng, 1995; Cheng e Chen, 2001); contemporaneamente la concentrazione di ammonio aumenta e quella di urea diminuisce (Cheng e Chen, 2001).

In *L. calacrifera* in seguito a trattamento cronico (4gg) con nitrito a concentrazioni di 30, 50, 70 e 80 mg l<sup>-1</sup>, si osserva un aumento dei livelli di ammonio nel sangue con un conseguente aumento nell'escrezione di questo ione (Woo e Chiu, 1997). Questo aumento non è legato a maggiori livelli di proteine o ad una stimolazione del catabolismo degli amminoacidi, dal momento che i livelli di proteine nel sangue restano invariati, ad eccezione che nei trattati alla concentrazione più alta. Questi autori hanno tuttavia osservato una riduzione di attività della glutammato deidrogenasi; ciò implica che l'ammoniaca extra non è prodotta da questo enzima, sebbene la sua importanza nella produzione di ammoniaca sia ben documentata in letteratura (Walton e Cowey, 1977; Randall e Wright, 1987), ma potrebbe derivare dal ciclo delle purine, in cui l'AMP è degradata ad opera dell'AMP deaminasi a produrre IMP ed ammonio (Raffin e Leray, 1980). Nei pesci, infatti, in condizioni di stress il pool di nucleotidi risponde rapidamente, soprattutto in ipossia (Van den Thillart et al., 1976; Giesy, 1988). Sempre in questa specie si osserva un aumento dei livelli di urea nel sangue probabilmente legati ad un incremento dei processi di uricolisi o arginolisi (Wright, 1993). Una forte diminuzione nei livelli di proteine, invece si osserva in *Clarias lazera* in seguito a trattamento con nitrito acuto e cronico con nitrito (Hilmy, 1987).

In trota iridea si osservano piccole variazioni nei livelli di escrezione di ammonio a livello delle branchie e delle urine (Zachariasen, 2001).

In *Anguilla anguilla* sottoposta per 24h a trattamento acuto con nitrito (0.15-1.5 mM) aumenta l'escrezione sia di ammonio che di urea, suggerendo che si abbia da un lato la stimolazione nel muscolo della degradazione degli adenilati, e dall'altra parte una stimolazione dei processi di uricolisi ed arginolisi (Huang e Chen, 2002).

## **2.5 Escrezione azotata nei teleostei**

L'escrezione azotata rappresenta quel processo che determina l'eliminazione delle sostanze azotate di rifiuto, prodotte dai processi coinvolti nel metabolismo dell'azoto. Tali sostanze sono l'ammonio, l'urea e l'acido urico. Tuttavia, questi non sono i soli composti utilizzati per eliminare l'azoto in eccesso; molti pesci marini, infatti, eliminano azoto come ossido di trimetilammina (TMAO), che può essere utilizzato come osmolita da molti elasmobranchi; altre sostanze sono l'allantoina e l'acido allantoico che provengono dalla degradazione delle purine. Nei pesci, i principali prodotti di rifiuto sono l'ammoniaca, piccole quantità di urea (come si osserva in Tab. 2.1) e di acido urico. Inoltre, la quantità di ammoniaca e di urea escreta, rappresenta un indicatore del metabolismo dell'azoto e dell'influenza dell'alimentazione e dei fattori ambientali sul metabolismo proteico (Goldstein e Foster, 1970).

### **2.5.1 Ammoniaca**

Il gruppo amminico che deriva dal catabolismo degli amminoacidi forma ammoniaca, sostanza tossica per molti organismi, che devono liberarsene rapidamente. Per gli animali acquatici ciò non rappresenta un problema. La grande disponibilità di acqua che caratterizza i loro habitat permette di solubilizzare e disperdere l'ammoniaca in modo da ridurre la sua tossicità. Essa diffonde attraverso superfici permeabili come le branchie e si combina con l' $H^+$  per formare  $NH_4^+$ , la maggior parte dei teleostei e tutti gli animali che eliminano principalmente ammonio come prodotto azotato di rifiuto sono definiti ammoniotelici (Jow et al., 1999).

### **2.5.2 Urea**

Si tratta di un composto idrosolubile con un grado intermedio di tossicità che viene trasportato nel sangue fino ai reni e quindi escreto nelle urine oppure attraverso le branchie. Sono animali ureotelici i mammiferi, gli anfibi, alcuni rettili, gli elasmobranchi ed alcuni teleostei. Alcuni teleostei possono effettuare il salto dall'ammonotelismo all'ureotelismo e viceversa. Tuttavia, nonostante l'urea sia meno tossica, la sua sintesi risulta maggiormente dispendiosa rispetto all'escrezione di ammonio; perciò il passaggio all'ureotelismo è spesso imposto da condizioni stressanti. E' il caso dell'*Opsanus beta* che diventa ureotelico in seguito a

confinamento; esso risponde con un aumento dell'attività della glutammina sintetasi epatica e un'elevata escrezione di urea (Walsh e Milligan, 1995).

**Tabella 2.1 - Livelli di escrezione di Ammonio-N ed Urea-N in diversi Teleostei, evidenziando quanto l'escrezione di azoto ammoniacale, con poche eccezioni, sia maggiore di quella ureica (modificato da Saha e Ratha, 1998).**

Specie	Habitat	Ammonio-N ( $\mu\text{M Kg}^{-1}$ peso corporeo $\text{h}^{-1}$ )	Urea -N ( $\mu\text{M Kg}^{-1}$ peso corporeo $\text{h}^{-1}$ )	Rapporto Ammonio-N: Urea-N
<b>Puramente acquatiche</b>				
<i>Cyprinus carpio</i>	FW	330	30	11.0
<i>Carassius auratus</i>	FW	194	30	6.5
<i>Oreochromis nilotica</i>	FW	763	130	5.5
<i>Onchorhynchus myliss</i>	FW	220	32	6.9
<i>Platichthys stellatus</i>	SW	253	34	9.4
<i>Liptocottus armatus</i>	SW	122	32	3.6
<i>Engraulis mordax</i>	SW	293	71	4.2
<i>Trachurus symmetricus</i>	SW	271	50	5.4
<i>Agonus cataphractus</i>	SW	645	127	5.1
<i>Cramlabus melops</i>	SW	372	18	21.0
<i>Limanda limanda</i>	SW	490	36	13.6
<i>Opsanus beta</i>	SW	75	22	3.4
<i>Oreochromis alkalicus grahami</i>	Lago Magadi, pH 10, 50% SW	0	7600	-
<i>Onchorhynchus clarki henshawi</i>	Lago Piramide, pH 9.4, ~ 10% SW	123	63	2.0
<i>Chalcarburnus tarichi</i>	Lago Van , pH 9.8	1041	607	1.7
<b>Pesci a respirazione aerea</b>				
<i>Amphipnous cuchia</i>	FW	171	5.0	34
<i>Clarias batrachus</i>	FW	421	74	5.7
<i>Heteropneustes fossilis</i>	FW	254	48	5.3
<i>Anabas testudineus</i>	FW	417	32	13.0
<i>Anabas scadens</i>	FW	921	600	1.5
<i>Channa punctatus</i>	FW	585	71	16.0
<i>Channa gachua</i>	FW	594	700	0.9
<i>Mystus vitatus</i>	FW	883	560	1.6
<i>Amia calva</i>	FW	607	60	10.1
<i>Blennius pholis</i>	FW	93	22	4.2
<i>Sycicases sanguineus</i>	BW	270	760	0.4
<i>Periophthalmus sobrinus</i>	40% SW	770	60	12.8
<i>Periophthalmus cantonensis</i>	BW	630	1260	0.5
<i>Periophthalmus cantonensis</i>	25% SW	445	305	1.5

### 2.5.3 Acido urico

È un composto semisolido fortemente insolubile e non tossico, negli organismi uricotelici come rettili terrestri e uccelli, l'acido urico rappresenta la forma principale di escrezione dei gruppi amminici degli  $\alpha$ -amminoacidi, ed è anche il prodotto finale del metabolismo delle purine.

### 2.5.4 Ammoniogenesi nei pesci

La maggioranza dell'ammonio in un pesce proviene dalla degradazione delle proteine strutturali e dietetiche (Wood, 1993; Wilkie, 1997; Ip et al., 2001) e la sua produzione è direttamente legata al tasso del catabolismo proteico (Van Waarde et al., 1983). Sebbene il sito principale per tale processo sia il fegato, la molecola può formarsi anche nel muscolo dalla deaminazione degli adenilati in animali sottoposti ad esercizio (Driedzic e Hochachka, 1976) oppure a bassi livelli di ossigeno ambientale (Van Waarde et al., 1983). L'escrezione di ammonio avviene per il 90% attraverso le branchie e solo il 10% è ad opera del rene (Maetz, 1972; Wood, 1993).

La formazione dell'ammoniaca si realizza per:

- Transdesaminazione;
- Glutaminasi;
- Ciclo AMP-deaminasi.

Nei teleostei marini, l'ammoniaca eliminata dalle branchie, può provenire sia dal sangue, dopo essersi formata nel fegato, nel rene e nel muscolo per processi di transdesamminazione e attraverso il ciclo AMP-deaminasi o può essere direttamente formata a livello delle branchie con gli stessi meccanismi. La relativa importanza di queste sorgenti di ammoniaca probabilmente varia tra le specie e secondo lo stato fisiologico e ambientale del pesce.

Nel ciclo AMP-deaminasi, l'acido aspartico funziona da raccoglitore di gruppi amminici, trasferendoli sull'IMP che si è formato dalla precedente deaminazione dell'AMP. L'acido glutammico, invece, raccoglie i gruppi amminici per cederli attraverso gli enzimi L-glutammato deidrogenasi e glutaminasi.

Vari tessuti contribuiscono alla produzione di ammoniaca con importanza variabile a seconda delle specie e delle condizioni. Goldstein e Forster (1971) hanno dimostrato che circa l'80% dell'ammoniaca è prodotta nelle branchie dove è stata misurata un'elevata attività delle glutaminasi e della glutammato deidrogenasi, pertanto questi autori hanno supposto che l'ammoniotelismo dei teleostei è dovuto alla deaminazione della glutammina. Altri autori hanno

riportato che il fegato è un sito importante nella formazione dell'ammoniaca, mentre un ruolo secondario svolgono il muscolo e rene (Wright, 1995).

### 2.5.5 Ureogenesi nei pesci

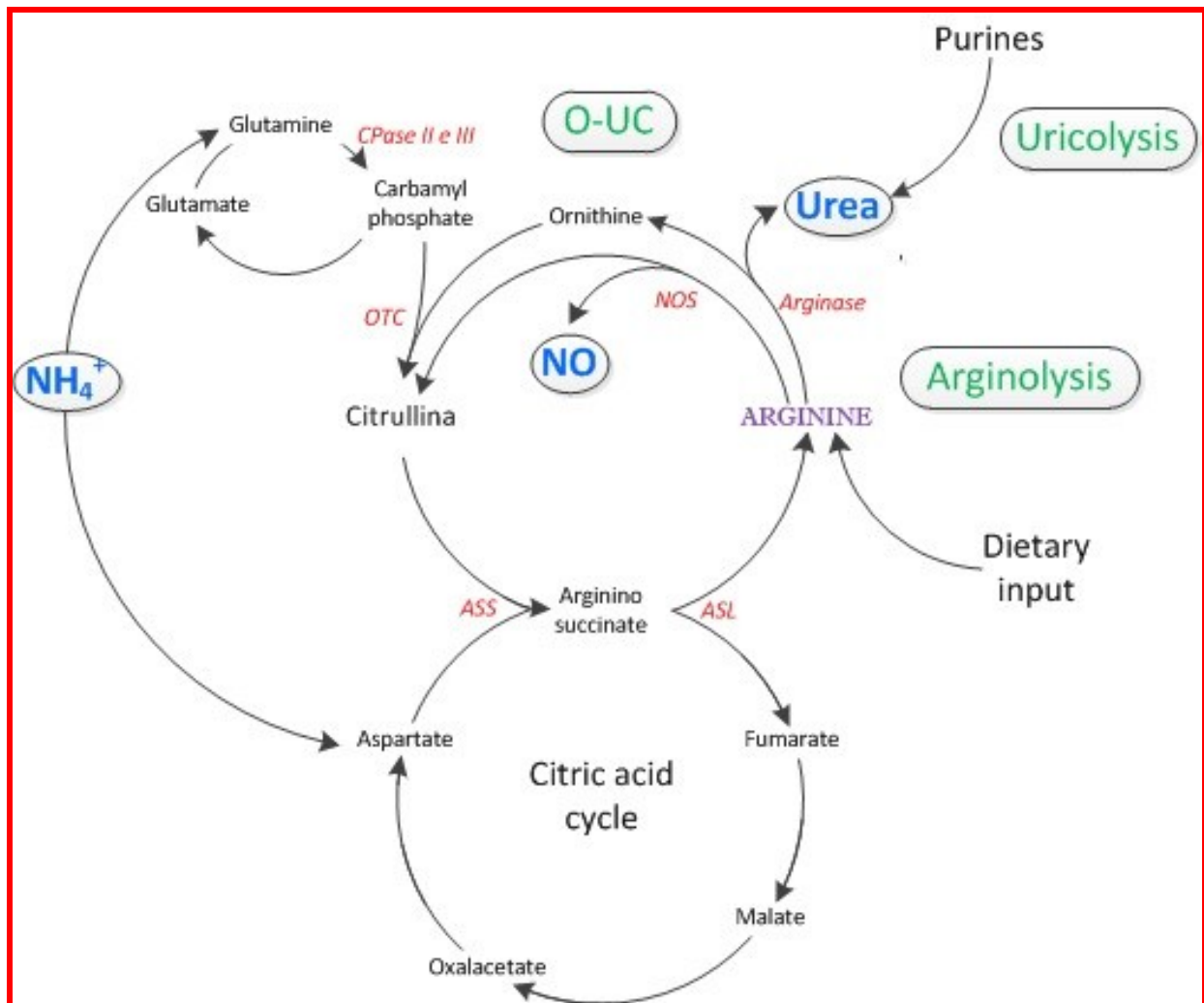


Figura 2.10 – Vie di sintesi dell'urea nei teleostei, e connessioni con il ciclo citrullina-NO e il ciclo di Krebs.

Circa l'80-90% dell'escrezione azotata nei pesci sia d'acqua dolce che di acqua di mare è sottoforma di ammoniaca; la rimanente parte, invece, è escretata come urea (Wood, 1993; Wright, 1995).

Come per l'ammonio anche per l'urea il fegato rappresenta il principale sito di produzione. Nei teleostei, tuttavia, anche il tessuto muscolare è un importante sito di produzione di urea. Esistono tre processi coinvolti nell'ureogenesi (Fig. 2.10): l'uricolisi, l'argininolisi e la sintesi di urea mediante la detossificazione dell'ammoniaca che avviene attraverso il ciclo dell'urea-ornitina (OUC), la predominanza di queste vie metaboliche varia a seconda delle specie considerate (Goldstein e Foster, 1971).

### 2.5.5.1 Arginolisi

Il processo arginolitico consiste nella degradazione dell'arginina esogena assunta con la dieta ad opera dell'arginase. L'arginase è l'ultimo enzima del ciclo OUC, che catalizza la trasformazione dell'L-arginina in ornitina e urea. Kaushik et al. (1988) hanno dimostrato, che la produzione di urea mediante l'azione dell'arginase è influenzata dai livelli di arginina libera presenti nel fegato. L'attività epatica dell'arginase in *Paralichthys olivaceus*, alimentato con diete nelle quali la quantità di arginina è al di sotto delle richieste stimate per tale specie, è bassa se paragonata con l'attività enzimatica misurata nei pesci alimentati con diete ricche di arginina (Alam et al., 2002). In particolare, la massima attività arginasica è stata osservata nei pesci alimentati con il 3.25% di arginina (Alam et al., 2002).

Nel rombo l'attività arginolitica aumenta significativamente all'aumentare dei livelli di arginina assunti con la dieta fino al raggiungimento di un plateau che si osserva con una quantità di arginina pari all'1.5% e 2%. La totale mancanza di tale aminoacido provoca la riduzione dell'attività arginasica e quindi della produzione di urea mediante arginolisi (Fournier et al., 2003).

Anche per il branzino *Dicentrarchus labrax*, l'attività dell'arginase aumenta in risposta ad un incremento di arginina assorbita nel fegato dei pesci alimentati con diete basate su proteine vegetali, mentre non si osserva alcun cambiamento dell'attività arginasica in seguito ad un elevato supplemento di arginina in diete basate su farina di pesce (Tulli et al., 2007). Contrariamente all'attività arginasica, l'attività epatica della OCT (ornitina carbamil transferasi) diminuiva significativamente con l'aumento di arginina nelle diete, indipendentemente dalla fonte proteica utilizzata, mentre sia nel rombo che nel branzino l'attività epatica della glutammato deidrogenasi (GDH) non è influenzata dalla percentuale di arginina aggiunta alla dieta (Tulli et al., 2007).

In alcuni teleostei, come ad esempio il rombo, la risposta dell'arginasi epatica ai diversi livelli di arginina aggiunti alla dieta permane fino a 24 ore dopo il pasto indicando un forte effetto della quantità di arginina presente nella dieta sull'attività arginasica e dando un'ulteriore conferma della predominanza della degradazione dell'arginina fornita con la dieta nella sintesi di urea (Gouillou-Coustans et al., 2002).

Tuttavia, può verificarsi una riduzione dell'attività arginasica in seguito alla somministrazione di diete ad eccessivo contenuto di arginina, che nel caso del rombo è pari a 4.8 - 8%, ciò suggerisce un possibile effetto di saturazione del substrato, provocato da un eccessivo supplemento di arginina (Fournier et al., 2003).



I dati sull'attività enzimatica combinati con quelli dell'escrezione ureica mostrano che il ciclo dell'urea non è pienamente funzionale nel fegato di molti teleostei come il pesce gatto (Anderson e Walsh, 1995), la trota arcobaleno (Chiu et al., 1986), il rombo (Gouillou-Coustans et al., 2002) e il branzino (Tulli et al., 2007). L'attività dell'OUC di tali specie è molto bassa ed incompleta, in quanto risulta che le attività degli enzimi del ciclo dell'urea-ornitina sono molto basse (si è osservata la mancanza di una significativa attività della CPS III e una ridotta attività della OCT) (Anderson e Walsh, 1995). La mancanza di un ciclo dell'urea funzionale può essere spiegato come una conseguenza della delezione o repressione dei geni che controllano l'espressione degli enzimi catalizzanti le reazioni del ciclo dell'urea. D'altronde il pieno complemento degli enzimi dell'OUC è stato trovato solo in pochi teleostei; così la degradazione dell'arginina contenuta nella dieta mediante l'attività arginasi è la fonte principale di sintesi di urea nel rombo (Gouillou-Coustans et al., 2002) e in molte altre specie come i pesci antartici nei quali il sistema arginina esogena/arginasi rappresenta essere un'importante fonte di urea (Rodrigues et al., 2006). Per concludere, la forte relazione esistente tra l'assorbimento dell'arginina esogena, l'attività dell'arginasi e l'escrezione di urea conferma che l'arginina assunta con la dieta gioca un importante ruolo nella modulazione del catabolismo dell'arginina così come la sintesi e l'escrezione di urea.

#### 2.5.5.2 Uricolisi

L'uricolisi rappresenta la principale via metabolica ossigeno – dipendente attraverso la quale si ha la degradazione delle purine esogene ed endogene a due moli di urea attraverso la lisi dell'acido urico. L'acido urico viene convertito in allantoina mediante l'uricase e successivamente in acido allantico, tale reazione è catalizzata dall'enzima allantoinasi. Infine, l'enzima allantoinasi catalizza la formazione dell'urea. Diversi autori considerano l'uricolisi come la via principale di sintesi di urea (Hayashi et al., 1989).

L'attività della via uricolitica è stata dimostrata in *H. fossilis*, in cui elevati livelli di attività di tutti gli enzimi uricolitici sono stati ritrovati nel tessuto epatico (Saha e Ratha, 1987). In *C. gariepinus* è stata osservata la presenza degli enzimi uricolitici non solo nel fegato ma anche nel rene (Terjensen et al., 2001).

I livelli di questi enzimi sono molto variabili nelle diverse specie di teleostei; sono particolarmente bassi ( $50 \mu\text{mol}$  di urea formata  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), in preparati enzimatici di fegato di merluzzo, e con valori molto più elevati ( $200 \mu\text{mol}$  in haddock; Goldstein e Forster, 1965).

Come tutte le vie metaboliche anche l'uricolisi può essere influenzata da fattori di stress ambientale.

In particolare, Fournier et al., (2002) hanno dimostrato che l'aggiunta di acidi nucleici all'alimentazione determina variazioni nei tassi di escrezione ureica in trota iridea e nel rombo. In tilapia d'acqua dolce (*Oreochromis mossambicus*) si ha aumento di 3–5 volte dei tassi di escrezione ureica dopo esposizione ad elevate concentrazioni di ammoniaca, imputabile ad una stimolazione dei processi di uricolisi (Wright, 1993).

### 2.5.5.3 Ciclo dell'urea

La sintesi di urea negli organismi ureotelici avviene principalmente nel fegato mediante il ciclo dell'urea, una via ciclica postulata per la prima volta da H.A. Krebs e K. Henseleit nel 1932. Essi dedussero le linee principali di tale ciclo partendo dall'osservazione che l'aggiunta di piccole quantità di ornitina e di arginina stimolano in modo catalitico la produzione di urea a partire da ammoniaca. Due gruppi amminici, che derivano da  $\alpha$ -amminoacidi e una molecola di anidride carbonica entrano nel ciclo, che, utilizzando l'energia dell'ATP, porta alla formazione di una molecola di urea.

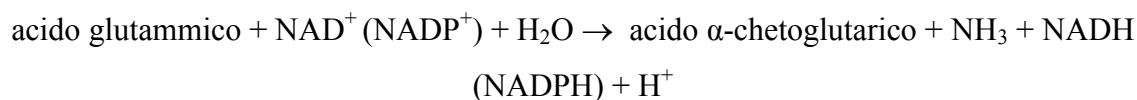
Alcuni studi suggeriscono una possibile localizzazione dell'OUC in tessuti diversi dal fegato, tali come l'intestino, il rene, il muscolo. Tuttavia, nei vertebrati che sintetizzano urea, il fegato rappresenta l'unico tessuto che esprime al completo la batteria di enzimi del ciclo dell'urea-ornitina. Tutti i vertebrati possiedono al completo i geni codificanti gli enzimi che catalizzano le reazioni del ciclo dell'urea-ornitina, quindi l'esistenza o meno di un ciclo dell'urea-ornitina funzionante dipende solo dall'espressione di tali geni. A causa dei bassi livelli di alcuni enzimi del ciclo dell'urea e dell'escrezione di ammonio come maggiore forma d'azoto, l'ipotesi che il ciclo dell'urea sia stato eliminato durante l'evoluzione dei teleostei è fortemente accettata. È stato dimostrato, tuttavia, che il ciclo è attivo in molti teleostei in fase giovanile (Anderson, 1976; Depeche et al., 1979; Chadwich e Wright, 1999).

Nei Selaci, la produzione di urea prevalentemente attraverso l'OUC; studi condotti su *Squalus* dimostrano (mediante l'utilizzo di acido urico, serina e bicarbonato marcati con  $^{14}\text{C}$ ) che la formazione di urea attraverso l'OUC è 50-100 volte più veloce rispetto a quella che avviene attraverso l'uricolisi. Inoltre la distribuzione degli enzimi del ciclo dell'urea nel fegato dei Selaci è del tutto simile a quella dei mammiferi (Hunter, 1929).

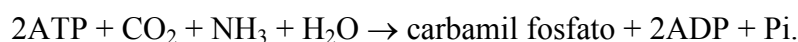
Il ciclo dell'ornitina-urea riveste un ruolo fondamentale nel metabolismo dell'azoto, esso prende parte sia all'anabolismo che al catabolismo degli amminoacidi ed è legato al ciclo dell'acido citrico. Nei pesci il ciclo dell'urea gioca un'importante ruolo nella detossificazione dell'ammonio durante lo sviluppo o durante l'esposizione a condizioni particolarmente

stressanti, come l'esposizione ad un pH particolarmente alcalino (pH 9.0 - 9.5) oppure ad un'elevata concentrazione di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Steele et al., 2001; Walsh et al., 1995).

Nei mammiferi, gli atomi d'azoto che entrano nel ciclo dell'urea hanno una diversa origine: il primo gruppo amminico deriva dalla deaminazione ossidativa del glutammato che avviene nei mitocondri del fegato ad opera della glutammato deidrogenasi:



Una reazione irreversibile di condensazione tra lo ione ammonio e l'anidride carbonica produce carbammil-fosfato, un composto molto instabile; per ciascuna molecola prodotta viene richiesta l'idrolisi di due molecole di ATP, la reazione è catalizzata dalla carbammil fosfato sintetasi (CPS-I) presente nella matrice mitocondriale:



Questa reazione, che avviene in almeno due passaggi, richiede N-acetil glutammato come stimolatore allosterico della CPS-I. L'enzima rappresenta il principale punto di controllo, e la produzione del carbamil fosfato rappresenta una fase obbligata del ciclo dell'urea. L'N-acetil glutammato si forma dalla reazione tra il glutammato e l'acetil-CoA catalizzata dall'N-acetil glutammato sintasi che è attivata da un aumento della concentrazione di arginina. Pertanto, in seguito ad un elevato catabolismo amminoacidico è presente una grande quantità di glutammato derivante: dalla degradazione della glutammina, dall'attività della glutammato deidrogenasi e dalle reazioni di transaminazione. Il carbammil-fosfato, prodotto nei mitocondri cede il suo gruppo carbamilico all'ornitina (essa si forma nel citoplasma ma entra nei mitocondri per mezzo di un sistema di trasporto specifico della membrana interna) attraverso l'ornitina transcarbamilasi (OCTasi), formando la citrullina, questo passaggio è poi seguito dai componenti citosolici del ciclo dell'urea che iniziano con l'arginosuccinato sintetasi che catalizza la reazione di combinazione della citrullina con aspartato, con formazione di arginina succinato che è poi degradato ad arginina e fumarato per azione dell'enzima arginosuccinato liasi. L'arginina formata in questa reazione diventa il precursore immediato dell'urea; infatti, l'arginasi idrolizza l'arginina per dare urea e rigenerare l'ornitina, che ritorna nel mitocondrio.

Gli enzimi del ciclo dell'urea nei pesci sono stati descritti per la prima volta descritti in largemouth bass (*Micropterus salmoides*, Anderson, 1976) e successivamente sono stati caratterizzati negli elasmobranchi (Anderson, 1980). La principale differenza con i mammiferi si ritrova a livello del primo degli enzimi del ciclo dell'urea, che nei pesci è la carbammil fosfato sintetasi III (CPasi III, Walsh, 1997). Questo enzima è simile alla CPasi I per il fatto che sintetizza carbammilfosfato nei mitocondri ed è attivato dall'acetil-glutammico, ma richiede

glutammina anziché ammoniaca come principale fonte di azoto (Anderson, 1981). Questo indica che nei pesci, il primo step nella fissazione dell'ammoniaca è la formazione di glutammina catalizzata dall'enzima mitocondriale glutammina sintetasi (Anderson, 1980).

Sono pochi i teleostei ureotelici (escrezione di urea > 50%). Tuttavia, la produzione di urea può essere legata ad una risposta da stress o legata ad adattamenti specifici.

Nei teleostei ureogenici e ureotelici obbligati come la tilapia del lago Magadi (*Oreochromis alcalicus grahami*) che vive nel lago Magadi in Kenia, dove la temperatura può raggiungere i 42°C ed il pH varia tra pH 9 -10, l'elevato pH dell'acqua impedisce l'escrezione di ammonio secondo il classico modello proposto per i teleostei (diffusione passiva, Wright et al., 1989). Questo animale, infatti, non espelle ammonio ma esclusivamente urea (100% N totale) attraverso le branchie, con un ciclo dell'urea pienamente attivo e funzionante (Randall, et al., 1989). Tra i teleostei sono anche annoverate alcune specie ureoteliche facoltative, come *Opsanus beta* che passa dall'ammoniotelismo all'ureotelismo in risposta a diverse situazioni stressanti (Walsh, 1997). È noto anche il caso della specie *Mugilogobius abei*, in cui l'escrezione di urea è legata alla necessità di detossificarsi dall stress da ammonio (Iwata et al., 2000).

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1Animali

La principale specie modello utilizzata nel presente studio è stato il pesce zebra (*Danio rerio*, Hamilton 1822). A fini comparativi sono state utilizzate altre due specie, la gambusia (*Gambusia affinis* Baird & Girard, 1853) e il carassio dorato (*Carassius auratus auratus*, Linnaeus, 1758). Immagini di esemplari tipici delle specie utilizzate sono riportate in Fig. 3.1.



Figura 3.1 - Le specie modello utilizzate nel presente studio. A sinistra, gambusia (di cui è evidente il dimorfismo sessuale: in alto la femmina, in basso il maschio); al centro, pesce zebra; a destra, carassio dorato.

Gli esemplari adulti di entrambi i sessi di pesce zebra (lunghezza corporea, BL, < 1.5 cm, peso medio ~ 0.5g) e carassio dorato (BL < 10 cm, peso medio ~10g) sono stati acquistati presso un fornitore locale di pesci per acquariologia (CARMAR, San Giorgio a Cremano, NA).

Gli esemplari di gambusia di taglia variabile (BL < 1.5 cm, peso medio ~ 0.4g), e di entrambi i sessi, sono stati pescati in un laghetto artificiale appartenente ad un Quagliodromo nei pressi di Cancellò Arnone (CE, Italia). L'identificazione della specie di gambusia è stata fatta in base al numero di raggi delle pinne dorsale e anale (Walters e Byron, 2000).

Gli animali sono stati mantenuti presso lo Stabulario per pesci, anfibi e rettili del Dipartimento delle Scienze Biologiche dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", in acquari del volume di circa 200 litri (Fig. 3.2). Gli animali sono stati tenuti in stabulazione per un periodo di almeno quaranta giorni, per consentire il loro adattamento alle condizioni di stabulazione.

Ciascun acquario è stato riempito con acqua di fonte ed acqua di osmosi (= acqua demineralizzata per osmosi inversa con apposito apparato, un Diaphragm pump) in un rapporto 3:1. L'acqua era continuamente filtrata con un pompa a filtro esterno (Rena Filstar xP3 France), areata con aeratore (NW 22, Newa Loreggia, Italia) e mantenuta alla temperatura costante di 27°C per pesce zebra e gambusia, grazie ad un termostato ad immersione (VISI-THERM, 50W), e 20°C per i pesci rossi (corrispondente alla temperatura ambiente dello stabulario). Le vasche

erano illuminate con lampade F18W/174 – T8 Silvania Acquastar, e con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio.

Per la verifica del buon funzionamento degli acquari e per assicurare il mantenimento delle condizioni ottimali per i pesci, il pH dell'acqua, la sua conduttività e il contenuto di ammoniaca, nitriti e nitrati (tutti parametri utili per accertare lo stato di salute di ambienti acquatici) sono stati tenuti costantemente sotto controllo. Il pH è stato misurato con regolarità e mantenuto entro valori compresi tra 6 e 7. Il contenuto di ammoniaca, nitriti e nitrati è stato controllato una volta a settimana mediante appositi kit commerciali (Acqua test kit, New Technology). La conduttività è stata misurata una volta a settimana con un conduttimetro (Conductivity tester 138 (II)) e mantenuta inferiore ai 1000  $\mu\text{S}$ , mediante aggiunta regolare di acqua di osmosi. Cambi di acqua del 50% erano effettuati mensilmente o in caso di aumento oltre la norma dei parametri su indicati. (Valori limite:  $< 1 \text{ mg l}^{-1}$  per lo ione ammonio,  $< 1 \text{ mg l}^{-1}$  per lo ione nitrito e  $< 10 \text{ mg l}^{-1}$  per lo ione nitrato).

I pesci sono stati alimentati con mangime secco in fiocchi (Tetramin, Tetra, Germany, proteine 48.0%, contenuto energetico  $20.1 \text{ KJ g}^{-1}$ ), somministrato una volta al giorno; due volte alla settimana, al posto del mangime secco, sono state somministrate larve di *Chironomus* congelate (Eschematteo srl, Polonia; Composizione: proteina grezza 7.01%, lipidi grezzi 1.06%, fibra grezza 0.32% ceneri grezze 0.76%, proteine grezze, contenuto energetico di  $21.9 \text{ KJ g}^{-1}$ ).

Durante tutto il periodo di mantenimento, gli animali manifestavano un comportamento normale, con i naturali comportamenti di esplorazione e interazione sociale tipici delle tre specie. In particolare, pesce zebra e gambusia manifestavano il loro tipico comportamento di shoaling (Angelon and Petranka, 2002; Spence et al., 2008).

La selezione degli animali da impiegare per gli esperimenti è avvenuta in modo random. Su tutti gli animali selezionati sono state effettuate le misure morfometriche necessarie a calcolare l'indice di benessere (K, condition factor). Animali con un K inferiore a 1.5 erano scartati. A seconda del protocollo sperimentale usato (vedi più avanti), gli animali sono stati o trasferiti nelle apposite vasche per i trattamenti specifici previsti dal protocollo, o isolati (nel caso di pesce zebra e gambusia) in nasse lasciate in vasca per 24-48h, per il mantenimento a digiuno prima della sperimentazione. Considerando le diverse caratteristiche comportamentali di pesce zebra e gambusia, sono stati impiegati, per queste due specie, due diversi tipi di nasse (Fig. 3.3). Il pesce zebra si sposta prevalentemente in orizzontale con velocità di nuoto relativamente alta di tipo burst e coasting. Viceversa, gambusia ha un nuoto più irregolare con continue escursioni verticali. Pertanto, per il pesce zebra sono state create delle nasse circolari delle dimensioni di 10x12, disposte orizzontalmente in vasca, mentre per gambusia sono state utilizzate nasse

circolari delle dimensioni di 50x17, disposte verticalmente in vasca. L'ultimo pasto somministrato ai pesci prima del periodo di digiuno è stato sempre a base di Tetramin.

Ove necessario, gli animali erano sacrificati per anestesia profonda con benzocaina alla concentrazione di 0.05-0.1mg ml<sup>-1</sup>, eventualmente seguita da congelamento rapido in azoto liquido. Tutte le procedure di trattamento degli animali sono state approvate dal CESA – Comitato Etico-Scientifico per la Sperimentazione Animale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.



Figura 3.2 - Vasca di stabulazione; delle stesse caratteristiche erano anche le vasche per gambusia e carassio dorato



Figura 3.3 - Le “nasse” utilizzate per selezionare gli individui di pesce zebra o gambusia per alcuni dei protocolli sperimentali del presente studio: nassa verticale per gambusia (di colore grigio) e nassa orizzontale per pesce zebra (di colore verde).

### 3.1.1 Determinazione del condition factor (K)

Lo stato di benessere di ogni pesce è stato valutato attraverso il valore del Fulton's condition factor:

$$K = 100 \times W \times BL^{-3}$$

in cui W è il peso dell'animale, espresso in grammi e BL (=lunghezza standard, cioè la distanza fra l'estremità del muso e la base della pinna caudale) in centimetri (Fulton, 1902).



Quindi il condition factor mette in relazione la lunghezza dell'animale con il suo peso.

La determinazione del condition factor (K) è stata effettuata sugli animali all'atto della loro selezione per il trattamento sperimentale. Il peso era determinato con l'impiego di un'apposita bilancia digitale, mentre la lunghezza esatta era valutata mediante l'analisi di immagine e con l'ausilio di uno specifico software. Per le misure, gli animali sono stati trasferiti singolarmente in camere rettangolari delle dimensioni di 10×16×5 cm per il carassio dorato e di 6.22×2.18×1.5 cm per pesce zebra e gambusia (Fig. 3.4). Una volta posto all'interno della camera, l'animale era fotografato con una macchina fotografica digitale. Ciascuna immagine era poi analizzata con il software Techdig (Copyright Ronald B. Jones) che consente di misurare la posizione relativa rispetto a 3 punti fissi dell'immagine, utilizzati per definire l'origine e le scale orizzontale e verticale di un piano di coordinate cartesiane.

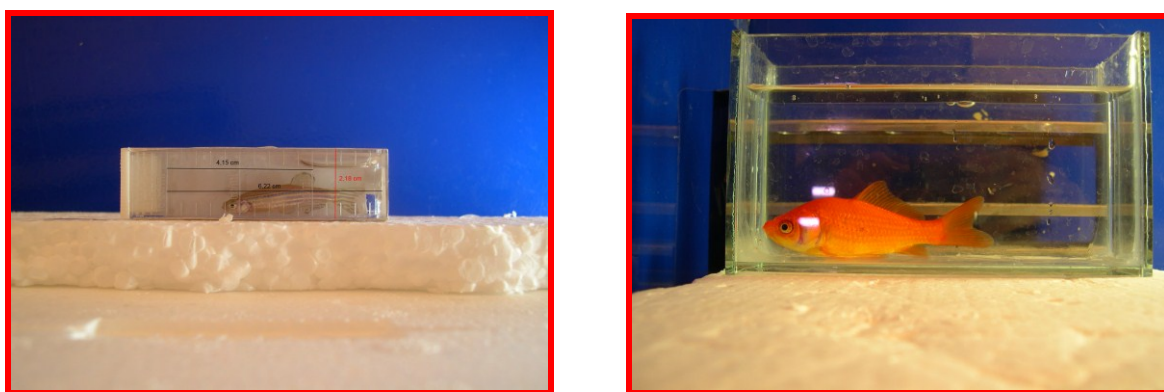


Figura 3.4 - Camere utilizzate per la determinazione del Condition Factor in pesce zebra e gambusia (a sinistra) e carassio dorato (a destra).

## 3.2 Metodi

### 3.2.1 Determinazione del consumo di ossigeno in condizioni routine (rMO<sub>2</sub>)

Salvo quando diversamente specificato, la determinazione del consumo di ossigeno nelle tre specie modello è stata effettuata su individui tenuti a digiuno per 48 ore.

E' stato dimostrato in pesce zebra, che il metabolismo di routine è influenzato dalla densità degli animali presenti nel respirometro. Singoli individui hanno un consumo specifico maggiore rispetto a gruppi di individui; il metabolismo diventa costante con una densità maggiore di 20-30 animali l<sup>-1</sup> (o di 10-15 g l<sup>-1</sup>), (Agnisola e Femiano, 2006). Pertanto la determinazione in pesce zebra è stata fatta su gruppi di 3 - 4 individui. Un'indagine preliminare ha dimostrato che, anche in gambusia, il consumo di O<sub>2</sub> dipende dalla densità in maniera simile al pesce zebra, pertanto anche in questa specie la determinazione è stata fatta su gruppi di animali, con densità identica a quella usata per pesce zebra (10 - 12 g l<sup>-1</sup>). Per il carassio dorato, la determinazione del consumo di ossigeno è stata effettuata su singoli individui.



Il consumo di ossigeno è stato effettuato mediante un sistema chiuso. Il respirometro (V. Fig. 3.5 e 3.6) consisteva di una camera termostata a una temperatura pari a quella di mantenimento degli animali (salvo quando diversamente previsto dal protocollo sperimentale), di 125 ml (per pesce zebra e gambaia) o di 443 ml (per il carassio dorato). Sul coperchio della camera era alloggiato un microelettrodo per  $O_2$  (YSI 5357 Micro Probe, USA), connesso ad un Oxygen Monitor System (YSI 5300 A), il cui segnale era acquisito mediante un software specifico (Picolog Pico Technology Ltd., UK) tramite un'interfaccia analogico-digitale (Pico Technology Ltd., UK) connessa ad un PC. L'acqua nel respirometro, salvo quando diversamente previsto dal protocollo sperimentale, era la stessa di quella di mantenimento o di trattamento, ed era ben aerata per essere equilibrata con l'ossigeno atmosferico e consentire la calibrazione dell'elettrodo al 100% di saturazione con  $O_2$ . Immediatamente prima di ogni misurazione, gli animali erano pesati; dopo il trasferimento dell'animale o degli animali nel respirometro, si attendeva un periodo variabile dai 10 ai 20 min, a seconda della specie, necessario per consentire l'adattamento al respirometro stesso. Dopo questo periodo, necessario anche ad ottenere la ristabilizzazione del segnale dell'elettrodo, che in genere subisce uno spostamento in seguito all'introduzione degli animali, si procedeva con l'interruzione dell'aerazione e la chiusura della camera. Si osservava, in queste condizioni, una progressiva caduta della concentrazione di ossigeno all'interno della camera in quanto l'ossigeno consumato dagli animali non poteva più essere rimpiazzato da quello presente nell'aria.



Figura 3.5 - Apparato per la misura del consumo di ossigeno in pesci.

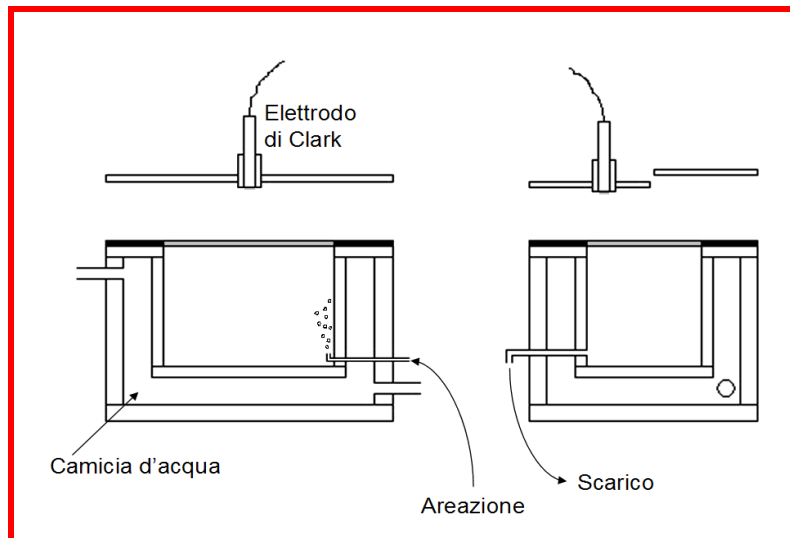


Figura 3.6 - Camera respirometrica per misura del consumo di ossigeno.

Trascorso il tempo necessario ad una riduzione di non più del 10-20% del contenuto di ossigeno (ben al di sopra della  $pO_{2crit}$ , cioè la  $pO_2$  al disotto della quale gli animali perdono la capacità di regolazione metabolica e il consumo diminuisce al diminuire della  $pO_2$ , Nilsson e Renshaw, 2004), la camera veniva riaperta e si riattivava l'aerazione. In Fig 3.7 è mostrato un tipico tracciato respirometrico.

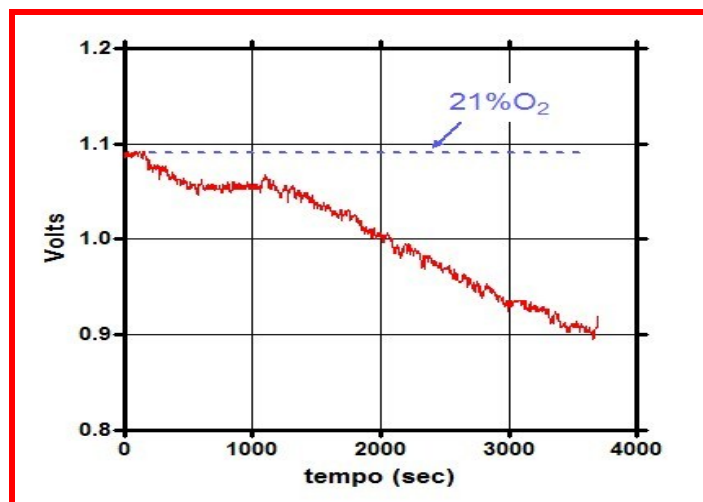


Figura 3.7 - Tipico tracciato respirometrico, in ascissa è riportato il tempo (sec) in ordinata il segnale dell'elettrodo di  $O_2$  (Volt).

Per una maggiore accuratezza delle misure di consumo di ossigeno, è stato anche determinato il consumo da parte dell'acqua in assenza di animali, al fine di valutare il contributo al consumo di un'eventuale contaminazione batterica. In tutti i casi, il consumo della sola acqua è risultato trascurabile.

### 3.2.1.1. Principio di funzionamento dell'elettrodo di Clark

L'elettrodo utilizzato per la misura del consumo della concentrazione di ossigeno disciolto è un elettrodo di Clark. L'elettrodo (vedi schema in Fig. 3.8) possiede un catodo di platino ed un anodo di Ag-AgCl, più una membrana permeabile all'ossigeno, che separa una soluzione salina di KCl saturo (nella quale sono immersi gli elettrodi) dalla soluzione di cui si vuole misurare il contenuto di O<sub>2</sub>.

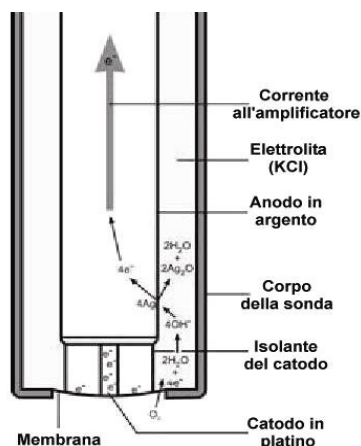
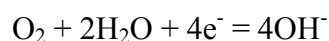
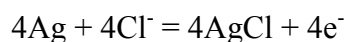


Figura 3.8 - Elettrodo a membrana di Clark per O<sub>2</sub>

L'ossigeno che diffonde attraverso la membrana raggiunge il catodo di platino dove subisce un processo di riduzione formando ione idrossido secondo la seguente reazione:



Gli elettroni necessari a tale processo sono forniti dall'anodo d'argento, che contemporaneamente, reagisce con gli ioni cloruro dell'elettrolita secondo la reazione:



A temperatura costante, la corrente che fluisce tra il catodo e l'anodo è direttamente proporzionale al livello di ossigeno presente nella soluzione di KCl saturo e, quindi, anche alla pressione parziale di ossigeno all'esterno della membrana. Questo significa che, a parità di differenza di potenziale tra i due elettrodi (che in genere è di 0,6 V), all'aumentare della quantità di ossigeno che diffonde attraverso la membrana aumenta proporzionalmente la corrente tra catodo e anodo.

### 3.2.1.2. Calcolo del consumo di ossigeno

Il consumo di ossigeno, misurato come variazione del contenuto di ossigeno nella camera del respirometro in funzione del tempo, era espresso in mg di O<sub>2</sub> consumato per ora e per Kg di animale.

Il contenuto di ossigeno era ricavato dalla pressione parziale di ossigeno nella camera, determinata con l'elettrodo. La pressione parziale di ossigeno era determinata dalla seguente espressione:

$$pO_2 = (AP - SVP) \times 0.2096$$

dove:

**AP** = pressione atmosferica (torr);

**SVP** = pressione di vapore saturo a 27°C (= 26.739 torr);

**0.2096** = percentuale di O<sub>2</sub> nell'aria atmosferica.

AP e SVP erano determinati giornalmente mediante un barometro (Oregon Scientific).

La pressione parziale di ossigeno era trasformata in concentrazione di ossigeno, moltiplicandola per la solubilità dell'ossigeno:

$$[O_2] = pO_2 \times \alpha$$

I valori di  $\alpha$  dipendono dalla salinità e dalla temperatura utilizzata e sono riportati in Tab. 3.1.

Tabella 3.1

Valori di  $\alpha$  (ml l<sup>-1</sup> torr<sup>-1</sup>) alle varie salinità e temperature di studio (determinate in accordo con Graham, 1987).

Temperatura (°C)	0‰	10‰	20‰	25‰	30‰	35‰
20	0.040	0.038	0.036	0.035	0.034	0.033
27	0.035	0.033	0.032	0.031	0.030	0.029

Dalla regressione lineare della relazione tra concentrazione di ossigeno e tempo veniva, infine, determinata la quantità (in mg) di ossigeno consumato nell'unità di tempo e per unità di massa corporea, conoscendo il volume del respirometro, la massa totale dell'animale o degli animali posti nel respirometro e tenendo conto del fatto che 1 ml l<sup>-1</sup> di ossigeno corrisponde a 1.30 mg l<sup>-1</sup> a 27°C e a 1.33 mg l<sup>-1</sup> a 20°C.

### 3.2.1.3 Determinazione dell'attività degli animali durante la misura respirometrica

Nella misura del consumo di ossigeno minimo (cioè della minima velocità metabolica necessaria a mantenere un organismo in vita, Brett e Groves, 1979) è necessario tener conto delle

caratteristiche comportamentali della specie considerate. Poiché molte specie di pesci presentano una attività basale spontanea, che può influenzarne il consumo metabolico, è stato introdotto il concetto di metabolismo di routine, inteso come il metabolismo di un pesce a riposo e a digiuno con una attività spontanea basale (Fry, 1957). Ciò implica che la misura di  $rMO_2$  deve essere accompagnata da una misura dell'attività degli animali. A questo scopo, nel presente studio è stato utilizzato come indice di attività il numero di volte in cui il pesce cambia direzione, ossia il numero di virate che esso compie in un determinato lasso di tempo (Agnisola e Femiano, 2006). Per valutare tale parametro era effettuata una videoregistrazione degli animali nella camera respirometrica per tutto il periodo di misura del consumo di ossigeno. Dopo aver selezionato tre minuti di registrazione all'inizio e alla fine del periodo di consumo, sono state contate le virate totali per ogni pesce nell'arco dei sei minuti. La media dei valori ottenuti è stata espressa come numero di virate  $\text{min}^{-1}$ . E' da notare che delle tre specie utilizzate nel presente studio, pesce zebra e gambusia presentano una evidente attività di routine, mentre il carassio dorato in genere tende a restare immobile.

### **3.2.2 Determinazione dell'escrezione di ammonio, urea e nitrito**

L'escrezione di ammonio-N, urea-N e nitrito-N è stata valutata misurando il rilascio di queste sostanze nell'ambiente in funzione del tempo. L'escrezione era espressa in  $\text{mmol-N h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  per quella azotata (ammonio-N ed Urea-N), e in  $\mu\text{mol-N h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  per quella di nitrito (Nitrito-N). A seconda di quanto previsto dal protocollo utilizzato, sono state effettuate misurazioni di escrezione media in vasca (pesce zebra e carassio dorato), in genere su un periodo di 24h, oppure l'escrezione individuale o di gruppi di individui in camere a volume definito, o direttamente nella camera respirometrica, simultaneamente alla misura del consumo di ossigeno, mediante prelievo di campioni di acqua a intervalli regolari.

### **3.2.3 Preparazione dei campioni di sangue e di omogenato muscolare**

#### **3.2.3.1 Prelievo di sangue in pesce zebra**

Il sangue è stato prelevato da ciascun individuo previa anestesia in benzocaina alla concentrazione di 0.05-0.1mg/ml, mediante pipette Pasteur (capillari) in vetro (diametro alla punta: 0.8-0.9 mm) eparinate (con eparina 1000 U  $\text{ml}^{-1}$ , portata ad essiccazione in stufa a 60-70°C per 30-40min).

Il sangue è stato prelevato dalla vena caudale, dopo aver effettuato con forbici chirurgiche un taglio addominale con un angolo di 45°C in senso postero-anteriore a partire dall'ano (Fig. 3.9).

Al termine del prelievo è stato misurata l'altezza della colonna di sangue prelevata all'interno del capillare (mm). Dalla misura del diametro del capillare e dalla lunghezza è stato poi calcolato il volume ( $\mu\text{l}$ ) di sangue prelevato da ciascun animale. In genere da ciascun animale venivano prelevati dai 4 ai 10  $\mu\text{l}$  di sangue.

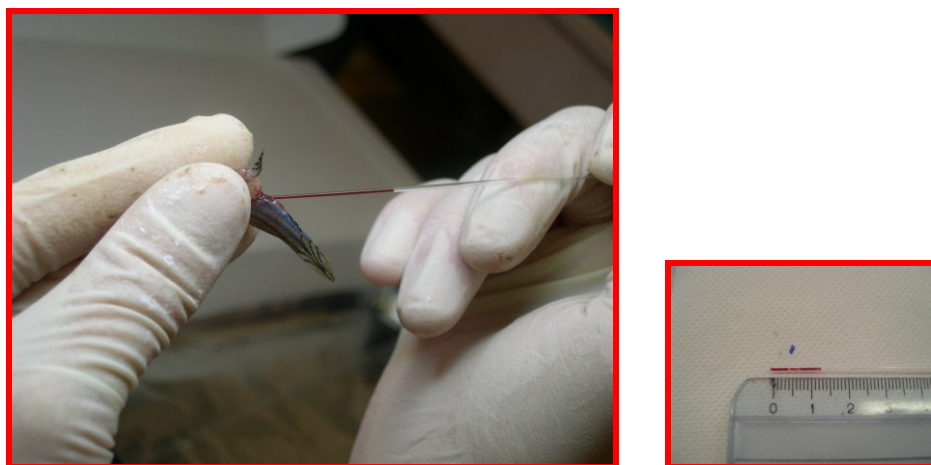


Figura 3.9 - Prelievo di sangue in pesce zebra

### 3.2.3.2 Prelievo di sangue in carassio dorato

Il sangue è stato prelevato da ciascun individuo previa anestesia in benzocaina alla concentrazione di  $0.05\text{-}0.1\text{ mg ml}^{-1}$ , con l'uso di specifiche siringhe caricate con 20  $\mu\text{l}$  di eparina  $1000\text{ U ml}^{-1}$ . Il prelievo è stato effettuato inserendo l'ago sotto le scaglie nella porzione centrale della coda appena sotto la linea laterale con un angolo di  $30^\circ$  lungo l'asse del pesce in direzione craniale (Fig. 3.10).

Al termine del prelievo, il sangue, è stato pesato in eppendorf pre-tarate su bilancia analitica. Dal peso e dal valore di densità ( $1.1\text{ mg } \mu\text{l}^{-1}$ ) è stato possibile ottenere il volume di sangue prelevato (Virani e Rees, 2000). In genere da ciascun animale venivano prelevati dai 10-30  $\mu\text{l}$  di sangue.

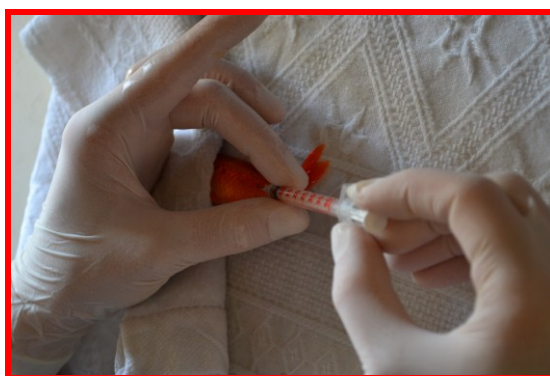


Figura 3.10 - Prelievo di sangue in carassio dorato

### 3.2.3.3 Trattamento dei campioni di sangue

Il sangue è stato trattato diversamente a seconda dell'analisi da effettuare.

#### *Trattamento I (Lattato, Ammonio, Urea)*

I campioni di sangue sono stati trattati secondo il metodo di Dalla Via et al. (1994). I campioni sono stati trasferiti in 1 volume di acido perclorico (PCA) al 6% con fluoruro di sodio (NaF) 4 mM e EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) 4 mM e centrifugati a 15000rpm per 15 min (Centrifuga per eppendorf, 5415C). Il surnatante è stato portato ad un pH compreso tra 6-7 utilizzando carbonato di potassio ( $K_2CO_3$ ) 2 M e fosfato di potassio bibasico ( $K_2HPO_4$ ) 100 mM. I campioni sono stati centrifugati a 15000rpm per 15 min a 4°C (Centrifuga per eppendorf, 5415C).

#### *Trattamento II (Nitrito)*

Il sangue una volta prelevato è stato trasferito in eppendorf pre-tarate contenenti 0.3 ml di solfato di zinco eptaidrato ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 4.31% a cui sono stati aggiunti, dopo mescolamento su vortex, 0.2 ml di acqua bidistillata e 0.05 ml di idrossido di sodio (NaOH) al 4%. I campioni sono stati tenuti in ghiaccio per 1 h e centrifugati 15.000rpm per 15 min a 4 °C (Centrifuga per eppendorf, 5415C). **Trattamento III (Emoglobina, metaemoglobina e nitrosilemoglobina)**

I campioni di sangue sono stati trasferiti in eppendorf pre-tarate contenenti 1 ml di tampone fosfato 20 mM (pH 7.3). Il debris cellulare è stato rimosso centrifugando per 1-2 min a 12000rpm; 1 ml del surnatante era quindi trasferito in cuvette da 1ml, per la determinazione dello spettro dell'emoglobina.

### 3.2.3.4 Prelievi del tessuto muscolare in pesce zebra e carassio dorato e preparazione degli omogenati

Gli animali utilizzati sono stati sacrificati mediante decapitazione. Immediatamente dopo il sacrificio sono stati eviscerati, puliti dalla pelle, eliminando pinne e coda. I tessuti sono stati prelevati, pesati, trasferiti rapidamente in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. Tutte le operazioni sono state effettuate a 4 °C.

Gli omogenati sono stati preparati diversamente a seconda dell'analisi per cui erano destinati.

#### *Trattamento I (Lattato, Ammonio, Urea)*

I muscoli prelevati sono stati pesati con bilancia digitale, dopo aver eliminato connettivo, scaglie ed eventuale sangue coagulato, sminuzzati ed omogeneizzati in un Potter Heidolph per 1 min (4 colpi per minuto, con una pausa di 15 sec tra un colpo e l'altro) in 4 volumi di acido

perclorico (PCA) al 7% e centrifugati per 15 min a 20000×g a 4°C con una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-30. Al termine il surnatante è stato prelevato, trasferito in tubi in ghiaccio e neutralizzato con una soluzione 3 M di carbonato di potassio ( $K_2CO_3$ ) e 0.1 M di Tri-etanolamina ( $C_6H_{15}NO_3$ ) fino a pH 7.5. Con prove preliminari si è stabilito che sono necessari 0.90 ml di neutralizzate per raggiungere il pH stabilito. I campioni neutralizzati sono stati poi centrifugati per 15 min a 20000×g a 4°C centrifuga Beckman Coulter Avanti J-30.

### *Trattamento II (nitrito)*

I muscoli prelevati sono stati pesati con bilancia digitale, dopo aver eliminato connettivo, scaglie ed eventuale sangue coagulato. Una parte del muscolo è stata omogeneizzata in un Potter Heidolph per 1 min (4 colpi per minuto, con una pausa di 15 sec tra un colpo e l'altro) in 6 parti di una soluzione di solfato di zinco eptaidrato ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 4.31%, 4 parti di acqua bidistillata e 1 parte idrossido di sodio (NaOH) al 4% (modificato da Shechter et al., 1972, Margiocco et al., 1983). L'omogenato è stato poi mantenuto in ghiaccio per 1 h, al termine è stato centrifugato per 15 min a 20000×g a 4°C con una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-30.

### *Trattamento III (CPSase III)*

I muscoli prelevati sono stati pesati con bilancia digitale, dopo aver eliminato connettivo, scaglie ed eventuale sangue coagulato e sminuzzati in 4 - 5 volumi di una soluzione contenente cloruro di potassio (KCl) 0.05 M, Hepes ( $C_8H_{18}N_2O_4S_1$ ) 0.05 M (pH 7.5), EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) 0.5 mM, ATP ( $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ) 0.01 M, cloruro di magnesio ( $MgCl_2$ ) 0.015 M, bicarbonato di sodio ( $NaHCO_3$ ) 5 mM, ditiotreitplo (DTT), ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ) 1 mM (Anderson, 1995). L'ATP, il cloruro di magnesio ed il bicarbonato erano inclusi nel buffer di estrazione al fine di massimizzare la stabilità dell'enzima estratto. I frammenti di muscolo erano poi omogeneizzati con questa soluzione in un Potter Heidolph per 1 min (4 colpi per minuto, con una pausa di 15 sec tra un colpo e l'altro).

L'omogenato così ottenuto è stato sonicato con un sonicatore Sonic Vibra Cell per un minuto. Il sonicato è stato poi centrifugato con una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-30 a 15000×g per 20 min a 4°C (Iwata et al., 2000). Il pellet era eliminato, ed il surnatante che costituisce la frazione solubile + il contenuto della matrice mitocondriale, era trasferito in provette per la successiva analisi.



### *Trattamento IV (OTCasi, ASS, ARG)*

I muscoli prelevati sono stati pesati con bilancia digitale, dopo aver eliminato connettivo, scaglie ed eventuale sangue coagulato e sminuzzati in 4 - 5 volumi di una soluzione contenente cloruro di potassio (KCl) 0.05 M, Hepes ( $C_8H_{18}N_2O_4S_1$ ), 0.05 M (pH 7.5), EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ) 0.5 mM, ditiotreitplo (DTT), ( $C_4H_{10}O_2S_2$ ) 1 mM (Wright et al., 1995). I frammenti di muscolo erano poi omogeneizzati in un Potter Heidolph per 1 min (4 colpi per minuto, con una pausa di 15 sec tra un colpo e l'altro).

L'omogenato così ottenuto è stato sonicato con un sonicatore Sonic Vibra Cell per un minuto. Il sonicato è stato poi centrifugato con una centrifuga Beckman Coulter Avanti J-30 a  $15000\times g$  per 20 min a  $4^\circ C$  (Iwata et al., 2000). Il pellet era eliminato, ed il surnatante che costituisce la frazione solubile + il contenuto della matrice mitocondriale, era trasferito in provette per la successiva analisi.

### **3.2.3 Saggi chimici e biochimici.**

#### **3.2.3.1 Determinazione cloruri**

Per la determinazione del contenuto di cloruri in acqua è stato utilizzato la procedura secondo le metodiche APAT ([www.apat.gov.it](http://www.apat.gov.it)), modificata per lavorare su piccoli volumi, che prevede la titolazione degli ioni cloruro con una soluzione di nitrato d'argento in ambiente neutro o leggermente basico, in presenza di cromato di potassio come indicatore. Dopo la precipitazione quantitativa del cloruro d'argento, si ha colorazione rosso mattone persistente, dovuta al cromato d'argento formato.

Reagenti impiegati per il saggio:

- Soluzione di riferimento di nitrato d'argento ( $AgNO_3$ ) 0.1N

L'esatta concentrazione di questa soluzione deve essere controllata, titolando soluzione di riferimento a concentrazione nota (cloruro di potassio (KCl) 0.1N).

Il calcolo della normalità esatta N della soluzione si effettua nel modo seguente:

$$N = \frac{N_1 \times V_1}{V_2}$$

dove:

$N_1$  = normalità della soluzione di KCl;

$V_1$  = volume della soluzione di KCl 0.1N usato per la titolazione;

$V_2$  = volume (ml) della soluzione di  $AgNO_3$  impiegato nella titolazione e corretto del bianco (titolazione con acqua bidistillata);

- Soluzione di riferimento di KCl 0,1 N;
- Soluzione di cromato di potassio: sciogliere 50g di cromato di potassio (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) in poca acqua. Aggiungere nitrato d'argento fino ad incipiente formazione di precipitato rosso. Lasciar sedimentare per 12 ore circa, filtrare e portare il filtrato ad 1 litro con acqua.
- Soluzione Standard (di riferimento)

I saggi sono stati effettuati su volumi di 5 ml. In questi 5ml erano aggiunti 50 µl di cromato di potassio (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) agitati al vortex, dopodiché veniva aggiunto nitrato di argento (AgNO<sub>3</sub>) poco per volta (5 µl alla volta) fino ad ottenere il viraggio. Per la calibrazione, si utilizzava una soluzione standard 0.01 N (0.5 ml di KCl 0.1 N + 4.5 ml di acqua bidistillata). Il volume medio di viraggio dello standard è risultato essere pari a 0.052 ml.

La concentrazione di cloruro era calcolata con la formula seguente:

$$Cl^{-}(mM) = \frac{(V_c - V_b) \times 100 \times FDc}{0.052 \times 10}$$

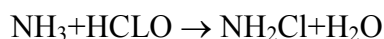
Dove:

- V<sub>c</sub>: è la quantità di nitrato di argento aggiunta al campione fino ad ottenere il viraggio, espresso in millilitri (ml);
- V<sub>b</sub>: è la quantità di nitrato di argento aggiunta al bianco fino ad ottenere il viraggio, espresso in millilitri (ml);
- FDc: è il fattore di diluizione del campione;
- 0.052: è la quantità espressa in ml di nitrato di argento necessaria a raggiungere il viraggio nella soluzione di KCl 0.01 N.
- 10: rappresenta il fattore di diluizione nella soluzione standard.

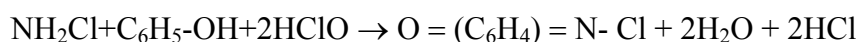
### 3.2.3.2 Saggio dell'ammonio

La concentrazione dell'ammonio è stata determinata utilizzando il metodo dell'Indofenolo (Solorazano, 1969). Questo metodo colorimetrico è basato sulla reazione dell'ammonio presente all'interno del campione con ipoclorito e fenolo, che in ambiente alcalino reagiscono determinando la produzione di indofenolo; la quantità di indofenolo prodotto risulta proporzionale al quantitativo di ammonio presente all'interno del campione.

Reazioni:



Clorammina



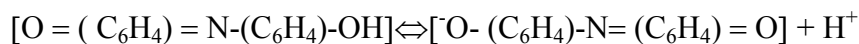
(chinon clorammina)

*Reazione di copulazione*



Indofenolo di colore giallo

*Reazione di dissociazione in ambiente alcalino*



Per accelerare la reazione viene utilizzato il nitroprussiato di sodio, un catalizzatore che ne aumenta anche la sensibilità. L'indofenolo, di colore blu, vien poi misurato spettrofotometricamente.

Come standard era utilizzata una soluzione di cloruro di ammonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), preparata a partire da una soluzione madre  $0.1 \text{ g l}^{-1}$ , diluita 1:100 al momento dell'uso.

Per il saggio erano preparati i seguenti reagenti:

- 1- Soluzione di Fenolo ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ): preparata sciogliendo 11.1 ml di fenolo liquido all'85% con etanolo ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) al 96% fino a raggiungere un volume finale di 100 ml. Solitamente la soluzione era preparata in aliquote di 10ml e sostituita settimanalmente.
- 2- Soluzione di nitroprussiato di sodio ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ). La soluzione era preparata in aliquote di 100 ml e sostituita 3 mesi.
- 3- Citrato alcalino: preparata sciogliendo 200 g di citrato di sodio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 10 g di idrossido di sodio ( $\text{NaOH}$ ) in un volume finale di 1 l con acqua bidistillata. La soluzione era preparata in aliquote di 100 ml e sostituita ogni 3 mesi.
- 4- Ipoclorito di sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 5%: la soluzione era preparata diluendo una soluzione madre al 15% in aliquote di 50 ml e sostituita ogni 2 mesi.
- 5- Soluzione ossidante: preparata al momento miscelando 10ml di citrato alcalino (soluzione 3) e 2.5 ml di ipoclorito di sodio al 5% (soluzione 4).

Per il saggio è stata usata una retta di taratura con concentrazioni di  $\text{N-NH}_3$  da 1.87 a 9.35  $\text{nmol ml}^{-1}$ . La reazione era avviata aggiungendo agli standard ed al campione (1 ml) da analizzare fenolo (40  $\mu\text{l}$ ), nitroprussiato di sodio (40  $\mu\text{l}$ ) e soluzione ossidante (100  $\mu\text{l}$ ) in successione. Le provette erano agitate delicatamente ad ogni aggiunta e tenute al buio per 1h. Al termine si provvedeva alla lettura dell'assorbanza a 640 nm con uno spettrofotometro per il visibile (spettrofotometro Hach, modello DR/240), con l'adattatore per cuvette da 1 ml, utilizzando cuvette in plastica da 1.5 ml (Dispolab Kaartell).

### 3.2.3.3 Saggio urea

La concentrazione di urea all'interno dei campioni è stata determinata utilizzando il metodo di Rahmatullah e Boyde (1989), modificato in accordo con McKenzie (comunicazione personale). Si tratta di un metodo colorimetrico diretto, che consente di determinare direttamente l'urea presente nel campione con il diacetil monoxime ed il tiosemicarbazide.

Come standard era utilizzata una soluzione di urea preparata come soluzione madre alla concentrazione di  $50 \text{ mg l}^{-1}$ , e diluita 1:150 al momento dell'uso. Per il saggio è stata usata una retta di taratura con concentrazioni di urea da 5.55 a  $27.55 \text{ nmol ml}^{-1}$ .

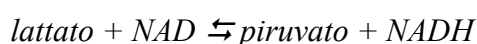
Per il saggio erano preparati i seguenti reagenti:

- Reattivo 1: 10 ml di una soluzione di cloruro di ferro anidro ( $\text{FeCl}_3$ )  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  da aggiungere ad acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) diluito mescolando 30 ml di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrato al 96% e 30 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata.
- Reattivo 2: 500 mg di 2,3-Butanedion monoxime ( $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$ ) + 10 mg Thiosemicarbazide ( $\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$ ) in 20 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata.
- Reagente urea: Reattivo 1 + Reattivo 2 nel rapporto di 2:1.

La reazione era avviata mescolando 1 ml di campione con 0.5 ml di reagente urea e mantenendo a b.m.b. le provette per 10 min al buio. Dopo il raffreddamento, mediante immersione in un bagno d'acqua a temperatura ambiente per 10 min, si procedeva alla lettura dell'assorbanza a 525 nm, con uno spettrofotometro per il visibile (spettrofotometro Hach, modello DR/240), con l'adattatore per cuvette da 1 ml, utilizzando cuvette in plastica da 1.5 ml (Dispolab Kaartell). La concentrazione di urea è stata sempre espressa in termini di concentrazione molare di azoto ureico (moli di urea-N =  $2 \times$  moli urea).

### 3.2.3.4 Saggio lattato

Il lattato è stato determinato con il metodo di Rees et al. (2009), modificato. L'L-lattato viene convertito a piruvato dall'enzima L-lattato deidrogenasi (L-LDH) in presenza di NAD (nicotinammide adenina dinucleotide):



in presenza di idrazina, il piruvato è trasformato in maniera irreversibile in idrazone. In queste condizioni tutto il lattato presente in un campione biologico è consumato dall'enzima, e la quantità di NADH che si forma è uguale alla quantità di lattato presente nel campione.

Il saggio prevedeva la preparazione dei seguenti reagenti:

- A. Soluzione tampone: 0.5 M glicina ( $C_2H_5NO_2$ )- 0.4 M idrazina solfato ( $N_2H_6SO_4$ ), pH 9.5;
- B. NAD : 25 mM in  $H_2O$  bidistillata;
- C. L-LDH: 5000 Unità  $ml^{-1}$ ;

A 50  $\mu l$  di campione venivano aggiunti 0.59 ml di  $H_2O$  bidistillata, 0.7 ml di A, 0.15 ml di B ed in ultimo 0.01 ml di C. Le provette erano agitate dopo ogni aggiunta dei reagenti. Dopo 30 min si procedeva alla lettura allo spettrofotometro. Il NADH formato può essere valutato misurando il suo assorbimento a 340 nm, tramite uno spettrofotometro ad UV (DU 800, Beckman Coulter). L'assorbimento per unità di concentrazione del lattato viene determinato con una curva di taratura con uno standard di lattato  $0.2\text{ mg ml}^{-1}$  con un intervallo di concentrazione da  $0.56\text{--}2.22\text{ }\mu\text{mol ml}^{-1}$ .

### 3.2.3.5. Saggio nitrito

La determinazione dei nitriti è stata eseguita con il metodo spettrofotometrico al reattivo di Griess (Shechter et al., 1972), molto sensibile, capace di rivelare piccole quantità di nitriti. In ambiente acido lo ione  $NO_2^-$  viene fatto reagire con il reattivo di Griess, che è formato da una miscela di acido solfanilico e N-(1-naftil)-etilendiammina. La solfanilammide in ambiente acido viene diazotata dallo ione nitrito. Successivamente il diazocomposto viene copulato con la N-(1-naftil)-etilendiammina formando un colorante azoico che presenta un massimo di assorbimento intorno a 520 nm (Fig. 3.11).

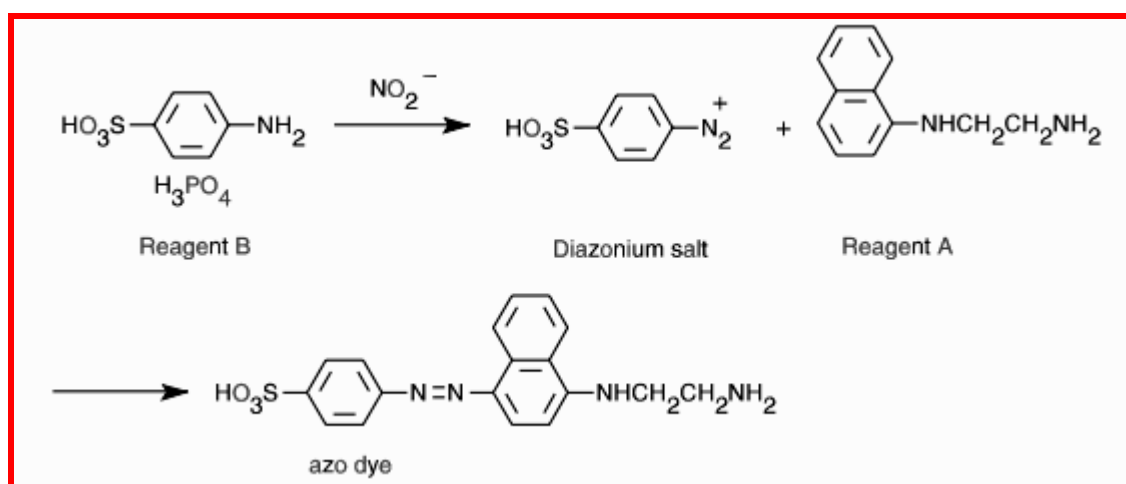


Figura 3.11 - Principio di quantificazione del nitrito usando il reattivo di Griess. Formazione di un azoto composto che può essere rilevato a 520nm.

Come standard era utilizzata una soluzione di nitrito di sodio, preparata a partire da una soluzione madre  $0.49\text{g/L}$ , diluita 1:100 al momento dell'uso. Si effettuava una retta di taratura

con concentrazioni di  $\text{N-NO}_2^-$  da 0.298 a 5.15  $\text{nmol ml}^{-1}$ . Per la determinazione del nitrito nel sangue e tessuti la retta di taratura era trattata come il campione (v. più avanti), e si utilizzava una soluzione madre 0.59  $\text{g l}^{-1}$ , diluita 1:10 al momento dell'uso, con concentrazioni di  $\text{N-NO}_2^-$  da 0.286 a 0.6  $\text{nmol ml}^{-1}$  per la retta di taratura.

La reazione era avviata aggiungendo agli standard ed al campione da analizzare 100  $\mu\text{l}$  di reattivo di Griess. Le provette erano agitate delicatamente e tenute al buio per 15 min. Al termine si provvedeva alla lettura dell'assorbanza a 520 nm con uno spettrofotometro per il visibile (Hach, modello DR 2400), con l'adattatore per cuvette da 1 ml, utilizzando cuvette in plastica da 1.5 ml (Dispolab Kaartell).

### 3.2.3.6 Saggio citrullina

La citrullina è stata determinata colorimetricamente, utilizzando i seguenti reagenti (Marshall e Cohen, 1972):

- Acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1M;
- Buffer redox: 0.9 g di ammonio solfato ferrico  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  + 1.1 g ammonio solfato ferroso  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 10 ml di Acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1 M;
- 30 ml di Acido Fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 7.4 M e 10ml di Acido Solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 3.0 M portati al volume di 60 ml con acqua bidistillata;
- 2,3-Butanedione Monoxine ( $\text{CH}_3\text{C(=NOH)COCH}_3$ ) 75 mM;
- Soluzione madre di L-citrullina ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ ) 10 mM;
- Soluzione standard di L-citrullina ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ ) 1 mM;

La determinazione è stata eseguita utilizzando una retta di taratura con concentrazioni di citrullina da 0.1-0.8  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ . La reazione era avviata aggiungendo a 1 ml di standard o campione, 0.25 ml di Buffer redox, 1.25 ml di miscela A. fosforico/A. solforico, e 0.5 ml di 2,3-Butanedione Monoxine 75 mM, dopo agitazione si trasferiva a b.m.b. le provette per 20 min al buio. Dopo raffreddamento mediante immersione in un bagno d'acqua per 15 min, si procedeva alla lettura dell'assorbanza a 490 nm allo spettrofotometro (Hach, modello DR 2400) con adattatore per cuvette da 1 ml, utilizzando cuvette in plastica da 1.5 ml (dispolab Kaartell).

### 3.2.3.7 Saggio proteico

Il contenuto proteico muscolare è stato determinato con il reattivo del Biureto (Gornall et al., 1949). Il saggio prevede la preparazione di una soluzione alcalina di solfato di rame; gli ioni rameici, in ambiente basico, si complessano con i legami peptidici, sviluppando un colore

azzurro, la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di proteine, contenute all'interno dei tessuti. Il numero dei legami peptidici, per unità di peso, è pressoché uguale per tutte le proteine e pertanto il dosaggio è poco influenzato dalla composizione amminoacidica delle diverse proteine. La reazione del biureto, è data da tutti i composti che contengono almeno due gruppi peptidici (-CO-NH) legati tra loro o direttamente, o per mezzo di un atomo di carbonio (peptidi, proteine) o per mezzo di un atomo di azoto, come nel biureto ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ). La determinazione dei campioni era accompagnata dalla determinazione di una curva di taratura, utilizzando come standard una soluzione di BSA ( $0.0125\text{mg ml}^{-1}$ ) e concentrazioni da  $0.51-2.57\mu\text{g ml}^{-1}$ . Dopo l'aggiunta del reattivo le provette erano incubate a  $37^\circ\text{C}$  per 30 min e poi lette a 550 nm allo spettrofotometro Hach (modello DR 2400) con adattatore per cuvette da 1 ml, utilizzando cuvette in plastica da 1.5 ml (dispolab Kaartell).

### 3.2.3.8 Saggio dell'OTCasi

L'attività dell'Ornitina carbamil-trasferasi (OTCasi, EC 2.1.3.3) è stata misurata dal tasso di formazione della citrullina a partire da ornitina e carbamilfosfato, mediante l'utilizzo di un metodo colorimetrico (metodo modificato da Marshall e Cohen, 1972):



L'attività è stata determinata a pH 8.5 ed alla temperatura di  $27^\circ\text{C}$ .

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

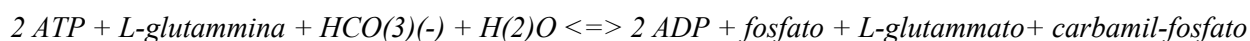
- A. Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris-HCl) 10 mM, pH 8.5 a  $27^\circ\text{C}$ ;
- B. L-Ornitina ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ), 50 mM, pH 7.5;
- C. Carbamil fosfato ( $\text{CH}_2\text{NO}_5\text{P}^{2-}$ ) 50 mM;
- D. Acido tricloroacetico ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) (TCA) 6.25 %

I reagenti B e C sono stati preparati subito prima dell'utilizzo. Il saggio consisteva nella stabilizzazione del buffer (reagente A, 2.3 ml) e dei substrati (reagenti B e C, 0.3 ml ciascuno) alla temperatura di  $27^\circ\text{C}$  e nell'incubazione del campione (0.1 ml) con la miscela di reazione (reagenti A+B+C) per 10 min. La reazione era poi bloccata con l'aggiunta del reagente D (3 ml) e la citrullina prodotta era determinata colorimetricamente con il metodo su riportato. L'attività specifica è stata espressa come  $\mu\text{mol}$  di citrullina prodotta  $\text{h}^{-1} \text{g}(\text{tessuto})^{-1}$  e/o  $\mu\text{mol}$  di citrullina prodotta  $\text{h}^{-1} \text{mg}(\text{Pr})^{-1}$ .

### 3.2.3.9 Saggio dell'CPSase III

L'attività dell'enzima Carbamil-fosfato sintetasi III (CPSasi III, EC 6.3.5.5) è stata misurata dal tasso di formazione della citrullina a partire da ornitina e carbamil-fosfato, mediante

l'utilizzo di un metodo colorimetrico (metodo modificato da Gouillou-Custans et al., 2002; Huggins et al., 1968 Brown and Cohen, 1972), e in presenza di UTP per bloccare l'attività della Carbamil-fosfato sintetasi II:



L'attività è stata determinata a pH 7.5 ed alla temperatura di 27°C.

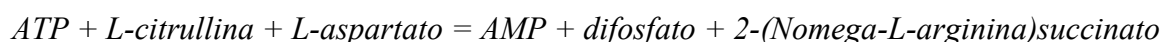
Sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- A. Ammonio bicarbonato ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 50 mM
- B. ATP ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$ ), 5 mM;
- C. Acido N-glutammico ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ), 5 mM;
- D. Solfato di magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), 25 mM;
- E. UTP ( $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{P}_3$ ), 1 mM
- F. Soluzione madre di glutammina ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ ), (210 mM), da cui preparare, al momento una soluzione 10 mM.

La miscela di reazione (MR) si preparava mescolando eguali volumi delle soluzioni A-E. Il saggio consisteva in una pre-incubazione per 10 min a 27°C di 0.5 ml di campione con 0.5 ml di MR. L'incubazione (60 min a 27°C) era avviata con l'aggiunta di 0.05 ml di glutammina 10 mM. La citrullina prodotta era poi determinata colorimetricamente con il metodo su riportato. L'attività specifica è stata espressa come  $\mu\text{mol}$  di citrullina prodotta  $\text{h}^{-1} \text{g}(\text{tessuto})^{-1}$  e/o  $\mu\text{mol}$  di citrullina prodotta  $\text{h}^{-1} \text{mg}(\text{Pr})^{-1}$ .

### 3.2.3.10 Saggio dell'ASS

L'attività dell'enzima Argininosuccinato sintetasi (ASS, EC 6.3.4.5) è stata misurata dal tasso di consumo della citrullina a partire da ornitina e carbammilfosfato, mediante l'utilizzo di un metodo colorimetrico (metodo modificato da Gouillou-Custans et al., 2002; Huggins et al., 1968 Brown e Cohen, 1972):



L'attività è stata determinata a pH 7. ed alla temperatura di 27°C.

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- A. Diidrogeno fosfato di potassio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 50  $\mu\text{M}$



B. L-citrullina ( $C_6H_{13}N_3O_3$ ), 5  $\mu$ M;

C. Solfato di magnesio ( $MgSO_4$ ), 8.75  $\mu$ M;

D. ATP ( $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$ ), 5  $\mu$ M;

E. Acido aspartico, ( $C_4H_7NO_4$ ), 50 mM, da cui preparare, al momento una soluzione 5  $\mu$ M.

La miscela di reazione (MR) si preparava mescolando eguali volumi delle soluzioni A-D. Il saggio consisteva in una pre-incubazione per 10 min a 27°C di 0.5ml di campione con 0.4ml di MR. L'incubazione (60 min a 27°C) era avviata con l'aggiunta di 0.1 ml di Acido aspartico (5  $\mu$ M). La citrullina rimanente determinata colorimetricamente con il metodo su riportato. L'attività specifica è stata espressa come  $\mu$ mol di citrullina utilizzata  $h^{-1} g(tessuto)^{-1}$  e/o  $\mu$ mol di citrullina utilizzata  $h^{-1} mg(Pr)^{-1}$ .

### 3.2.3.11 Saggio dell'Arginasi

L'attività dell'enzima arginasi (EC 3.5.3.1) è stata misurata dal tasso di formazione di urea, mediante l'utilizzo di un metodo colorimetrico (Sigma, [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)):



L'attività è stata misurata a pH 9,5 ed alla temperatura di 27°C.

Per la valutazione dell'enzima sono stati preparati i seguenti reagenti:

- **Reagente A:** (50 mM Manganese Maleate Activation Buffer, pH 7.0 a 27°C°) :

Costituito da due componenti che devono essere preparati separatamente:

- 1) Solfato di manganese ( $MnSO_4$ ), 100 mM (da preparare al momento)
- 2) Acido maleico ( $C_4H_4O_4$ ), 125 mM

Il reagente A è stato ottenuto combinando 5 ml del componente 1 e 4 ml del componente 2 equilibrati a 27°C e portati a pH 7. La soluzione così ottenuta è stata poi diluita ad un volume finale di 10ml;

- **Reagente B:** L-Arginina, ( $C_6H_{14}N_4O_2$ ), 713 mM, a pH 9.5, preparata al momento;
- **Reagente C:** Omogenato attivato, preparato mescolando 1 ml di omogenato con 2 ml di reagente A ed 1 ml di acqua bidistillata;
- **Reagente D:** soluzione madre di urea ( $CH_4N_2O$ ), 20 mM, pH 9.5
- **Reagente E:** Urea 2 mM, pH 9.5, preparata al momento per diluizione del reagente D.
- **Reagente urea:** la cui preparazione è riportata più sopra.

Il saggio prevedeva una pre-incubazione (60 min a 27°C) del reagente C, ovvero dell'omogenato attivato. L'incubazione (30 min, 27°C), durante la quale avviene la reazione, è stata effettuata con l'aggiunta di 0.4 ml del reagente B. La reazione è stata poi bloccata in

seguito all'aggiunta del reattivo dell'urea, impiegato anche per la determinazione della concentrazione di urea (metodo modificato Rahmatullah e Boyde, 1980).

La reazione era avviata tenendo a b.m.b. le provette per 12 min al buio. Dopo raffreddamento mediante immersione in un bagno d'acqua si procedeva alla lettura dell'assorbanza a 535 nm allo spettrofotometro (Hach, modello DR 2400) con adattatore per cuvette da 1 ml, utilizzando cuvette in plastica da 1.5 ml (dispolab Kaartell). L'attività specifica è stata espressa come  $\mu\text{mol}$  di urea formata  $\text{h}^{-1} \text{g}(\text{tessuto})^{-1}$  e/o  $\mu\text{mol}$  di urea formata  $\text{h}^{-1} \text{mg}(\text{Pr})^{-1}$ .

### 3.2.3.12 Deconvoluzione dello spettro di emoglobina

Al fine di determinare la composizione percentuale di ossiemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ), metaemoglobina (metaHb) e nitrosilemboglobina ( $\text{HbNO}$ ) nel sangue, è stata utilizzata la tecnica della deconvoluzione dello spettro di emoglobina (Jensen, 2007). Lo spettro era determinato con uno spettrofotometro DU 800, Beckman Coulter, nel range 480-700 nm, con step di 0.2 nm. La scansione era completata entro 3 min dalla preparazione del campione di sangue (v. Trattamento dei campioni di sangue - Trattamento III). Assumendo che il campione di emoglobina è una miscela di  $\text{HbO}_2$ , deossiHb, metaHb e  $\text{HbNO}$ , e in base alla legge di Lambert-Beer, l'assorbanza ( $A$ ) ad ogni lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) sarà la somma del contributo di ciascuna delle 4 forma di Hb, in accordo con l'equazione:

$$A_{\lambda} = [(C_{\text{ossiHb}} \times \epsilon_{\text{ossiHb}, \lambda}) + (C_{\text{deossiHb}} \times \epsilon_{\text{deossiHb}, \lambda}) + (C_{\text{metaHb}} \times \epsilon_{\text{metaHb}, \lambda}) + (C_{\text{HbNO}} \times \epsilon_{\text{HbNO}, \lambda})] \times l \quad (1)$$

Dove  $C$  è la concentrazione millimolare di ciascuna forma di Hb,  $\epsilon$  rappresenta il coefficiente di estinzione molare di ciascuna forma di Hb alla lunghezza d'onda  $\lambda$ , ed  $l$  rappresenta lo spessore della cuvetta (1 cm). La relazione di tra  $\epsilon$  e  $\lambda$  per ciascuna forma di Hb, nel range 480-700nm è stata determinata preventivamente secondo quanto descritto da Jensen (2007). L'analisi dello spettro per la deconvoluzione è stata effettuata adattando l'equazione (1) allo spettro del campione usando la regressione non lineare (col metodo dei minimi quadrati) basata sull'algoritmo di Levenberg-Marquardt, con il software statistico Origin 7 (OriginLab Corporation).

### **3.3 Protocolli sperimentali**

#### **3.3.1 Stress da salinità in pesce zebra e gambusia**

È stato valutato l'effetto dell'aumento acuto dei seguenti livelli di salinità: 10‰, 20‰ (pesce zebra e gambusia), 25‰ (solo pesce zebra), e 30‰ e 35‰ (solo gambusia) a 27°C (temperatura di acclimatazione).

Per ciascuna condizione è stato selezionato e tenuto a digiuno per 48h un gruppo di 15 animali (pesce zebra) o 20 animali (gambusia). Ciascun gruppo è stato suddiviso in 5 sottogruppi, su ciascuno dei quali sono stati valutati  $rMO_2$ , attività di routine ed escrezione azotata (Ammonio-N+ Urea-N). Per ogni misura di  $rMO_2$  è stata effettuata una videoregistrazione per l'acquisizione dei filmati da utilizzare per la determinazione dell'attività ed un prelievo di acqua all'inizio e alla fine del periodo di misura del consumo di ossigeno per i saggi di ammonio ed urea e determinazione dell'escrezione azotata (Ammonio-N + Urea-N). Non è stata osservata mortalità a seguito di questo trattamento.

#### **3.3.2 Stress da temperatura in pesce zebra e gambusia**

È stato valutato l'effetto della diminuzione acuta temperatura da 27°C (temperatura di acclimatazione) a 20°C. Per ciascuna condizione è stato selezionato e tenuto a digiuno per 48h un gruppo di 15 animali (pesce zebra) o 20 animali (gambusia). Ciascun gruppo è stato suddiviso in 5 sottogruppi, su ciascuno dei quali sono stati valutati  $rMO_2$ , attività di routine ed escrezione azotata (Ammonio-N+ Urea-N). Per ogni misura di  $rMO_2$  è stata effettuata una videoregistrazione per l'acquisizione dei filmati da utilizzare per la determinazione dell'attività ed un prelievo di acqua all'inizio e alla fine del periodo di misura del consumo di ossigeno per i saggi di ammonio ed urea e determinazione dell'escrezione azotata (Ammonio-N + Urea-N). Non è stata osservata mortalità a seguito di questo trattamento.

#### **3.3.3 Stress combinato da salinità e temperatura in pesce zebra e gambusia**

È stato valutato l'effetto della diminuzione acuta temperatura da 27°C (temperatura di acclimatazione) a 20°C, combinato con il trasferimento acuto in alla salinità del 25‰ (pesce zebra), o 35‰ (gambusia). Per ciascuna condizione è stato selezionato e tenuto a digiuno per 48h un gruppo di 15 animali (pesce zebra) o 20 animali (gambusia). Ciascun gruppo è stato suddiviso in 5 sottogruppi, su ciascuno dei quali sono stati valutati  $rMO_2$ , attività di routine ed escrezione azotata (Ammonio-N+ Urea-N). Per ogni misura di  $rMO_2$  è stata effettuata una videoregistrazione per l'acquisizione dei filmati da utilizzare per la determinazione dell'attività

ed un prelievo di acqua all'inizio e alla fine del periodo di misura del consumo di ossigeno per i saggi di ammonio ed urea e determinazione dell'escrezione azotata (Ammonio-N + Urea-N).

Non è stata osservata mortalità a seguito di questo trattamento.

### **3.3.4 Stress da nitrito e da ipossia ambientale**

Poiché tra gli scopi del presente studio c'è la comparazione fra gli effetti dell'ipossia ambientale e quelli dell'ipossia funzionale indotta da nitrito, i protocolli sperimentali relativi a queste due condizioni stressogene presentano dei punti in comune. In particolare, è stato necessario utilizzare un adattamento degli animali ad una condizione di assenza di ricircolo e filtrazione dell'acqua e alla riduzione dei livelli di cloruri, finalizzati a limitare la competizione con l'assorbimento dello ione nitrito. Nessuno dei trattamenti descritti qui di seguito ha indotto mortalità.

#### **3.3.4.1 Stress da nitrito**

Il protocollo sperimentale, come mostrato in Fig. 3.12, prevedeva una settimana di adattamento degli animali (pesce zebra e carassio dorato) seguita da 48 h di trattamento con acqua il cui contenuto di cloruri, che in partenza era 500µM era ridotto a livelli inferiori a 100µM.

Sono state impiegate tre tipologie di vasche per ciascuna specie, nelle quali erano trasferiti gli animali nello stesso numero e densità già descritti per lo stress da ipossia. L'adattamento era identico per le tre vasche e a quanto già riportato per lo stress ipossico. Il trattamento, invece, era diverso per gli animali delle tre tipologie di vasche: vasca controllo, utilizzata per simulare il trattamento e nella quale si effettuava il cambio di acqua per ridurre il contenuto di cloruri, come già descritto per lo stress da ipossia, ma non era aggiunto il nitrito di sodio; vasca 10, avente una concentrazione di nitrito di sodio 10 µM, e vasca 2 con una concentrazione di nitrito di sodio 2 mM.

Per ciascuna specie, gli animali sono stati suddivisi in gruppi, suddivisi a loro volta in tre sottogruppi corrispondenti alle tre tipologie di vasca (controllo, vasca 10 e vasca 2). Su ciascun gruppo si effettuava un diverso tipo di analisi:

a) gruppo metabolismo: In ciascun sottogruppo, immediatamente prima del trattamento, a 24 h e a 48 h di trattamento, sono stati misurati, nella stessa acqua della vasca, il consumo di ossigeno, l'attività di routine e l'escrezione azotata (Ammonio-N + Urea-N). Inoltre è stata valutata

l'escrezione azotata media a 24 e 48 ore di trattamento, sulla base dell'accumulo di ammonio-N ed urea-N nell'acqua delle vasche di trattamento.

b) gruppo parametri ematici: in ciascun sottogruppo, alla fine delle 48 ore di trattamento, si effettuavano prelievi sangue per la determinazione dei livelli di ossiemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ), metaemoglobina (methHb) e nitrosilemoglobina ( $\text{HbNO}$ ) e del contenuto ematico di nitrito-N, ammonio-N, urea-N e lattato.

c) gruppo parametri muscolari: in ciascun sottogruppo, alla fine delle 48 ore di trattamento, erano prelevati i tessuti muscolari per la successiva determinazione di: nitrito-N, ammonio-N, urea-N, lattato e l'attività dell'arginasi. In pesce zebra, sono state valutate anche le attività di CPSasi III, OTCasi e ASS.

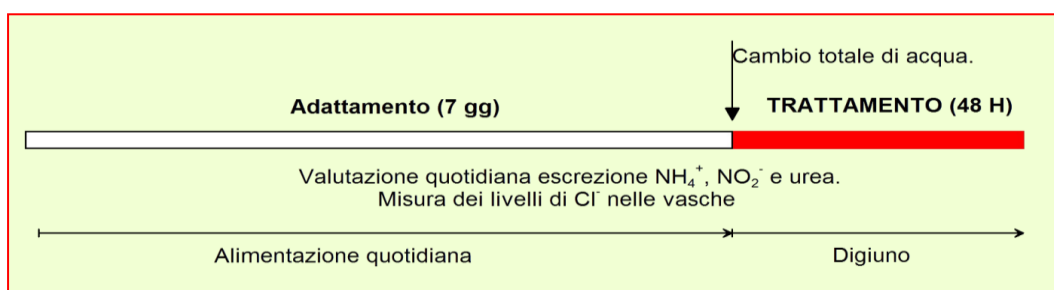


Figura. 3.12 - Schema descrittivo del protocollo sperimentale "stress da nitrito".

### 3.3.4.2 Stress da ipossia

Il protocollo sperimentale, come mostrato in Fig 3.13, prevedeva una settimana di adattamento degli animali (pesce zebra e carassio dorato) seguita da 48 h di trattamento con acqua il cui contenuto di cloruri, che in partenza era  $500\mu\text{M}$  era ridotto a livelli inferiori a  $100\mu\text{M}$ .

*Adattamento (7 gg):* Gli animali, selezionati in modo random dalle vasche di mantenimento sono stati trasferiti 30 pesce zebra per ciascuna vasca, (densità,  $0.024\text{g l}^{-1}$ ) e 5 pesci rossi per ciascuna vasca, (densità,  $0.42\text{g l}^{-1}$ ), in apposite vasche del volume di 25 L, prive di filtro biologico, con acqua ottenuta mescolando acqua di fonte filtrata ed acqua di osmosi nel rapporto 3:1. L'acqua di ciascuna vasca era areata con areatore (NW 22, Newa Loreggia, Italia) e mantenuta alla temperatura costante di  $27^\circ\text{C}$  con un termostato ad immersione (VISI-THERM, 50W) per pesce zebra e  $20^\circ\text{C}$  per i pesci rossi. Le vasche erano illuminate con una lampada F18W/174 – T8 Silvania Acquastar con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio. Durante la settimana di adattamento gli animali erano alimentati, ad orari definiti, alternando mangime in scaglie e larve di *Chironomus* e tenuti a digiuno durante le 48 h di trattamento, per evitare un aumento di ammonio e nitriti in vasca. Quotidianamente erano effettuati cambi di acqua del 50% ad 1h dalla

somministrazione del mangime, mantenendo lo stesso rapporto tra acqua di fonte filtrata ed acqua di osmosi e monitorando prima e dopo il cambio i livelli di ammonio, urea e nitriti e cloruri.

*Trattamento* (48 h): alla fine del periodo di adattamento, al fine di abbassare i livelli dei cloruri, si effettuava un cambio totale dell'acqua con acqua avente un rapporto 1:10 tra acqua di fonte filtrata ed acqua distillata/osmosi. Durante le 48 ore successive, si effettuavano cambi del 50%, mantenendo eguale il rapporto tra acqua di fonte filtrata e acqua distillata/osmosi, monitorando prima e dopo il cambio i livelli di ammonio, urea e nitriti e cloruri. Inoltre, gli animali erano tenuti a digiuno, per limitare l'accumulo dei derivati del catabolismo proteico, e per ridurre gli effetti metabolici dell'alimentazione (SDA, o azione dinamico-specifica degli alimenti), ai fini delle determinazioni successive.

*Ipossia*: alla fine del periodo di trattamento, gli animali erano sottoposti ad uno stress ipossico acuto, le cui condizioni erano diverse per le due specie:

**Pesce zebra**: gli animali erano trasferiti in una vasca termostata a 27°C del volume di 2 litri, ad una densità di 10g l<sup>-1</sup>; dopo un'iniziale fase di acclimatazione (PO<sub>2</sub> = 100%), il contenuto di ossigeno nella camera era ridotto nell'arco di 30 min al 30% di PO<sub>2</sub> insufflando azoto e monitorando costantemente la diminuzione del contenuto di ossigeno mediante apposito elettrodo di Clark. La condizione ipossica (che corrisponde a ~3 mg l<sup>-1</sup>) è stata mantenuta per 1.5 h. Durante il periodo di ipossia sono stati effettuati dei prelievi regolari di acqua per la determinazione dell'escrezione azotata. Alla fine del trattamento ipossico, gli animali sono stati sacrificati, come riportato negli appositi paragrafi, per il campionamento del sangue, per l'analisi del contenuto ematico di nitrito-N, Urea-N e lattato, e del tessuto muscolare, per l'analisi del contenuto muscolare di nitrito-N, Ammonio-N, Urea-N, lattato e attività arginasi.

**Carassio dorato**: gli animali erano trasferiti in una vasca termostata a 20°C del volume di 10 litri, ad una densità di 1.54 g l<sup>-1</sup>; dopo un'iniziale fase di acclimatazione (PO<sub>2</sub> = 100%), il contenuto di ossigeno nella camera era ridotto nell'arco di 30 min al 15% di PO<sub>2</sub> insufflando azoto e monitorando costantemente la diminuzione del contenuto di ossigeno mediante apposito elettrodo di Clark. La condizione ipossica (che corrisponde a ~1.6 mg l<sup>-1</sup>) è stata mantenuta per 5 h. Durante il periodo di ipossia sono stati effettuati dei prelievi regolari di acqua per la determinazione dell'escrezione azotata. Alla fine del trattamento ipossico, gli animali sono stati sacrificati, come riportato negli appositi paragrafi, per il campionamento del sangue, per l'analisi ematico di nitrito-N, Urea-N e lattato, e del tessuto muscolare, per l'analisi del contenuto muscolare di nitrito-N, Ammonio-N, Urea-N, lattato e attività arginasi.

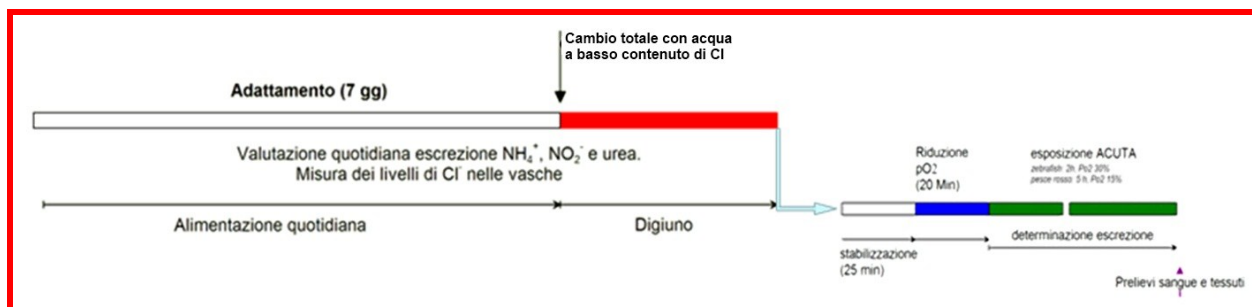


Figura 3.13. Schema descrittivo del protocollo sperimentale “stress da ipossia”

### 3.3.5 Stress combinato da nitrito e ipossia

Il protocollo sperimentale, come mostrato in Fig. 3.14, prevedeva una settimana di adattamento degli animali (pesce zebra e carassio dorato) seguita da 48 h di trattamento con acqua il cui contenuto di cloruri, che in partenza era 500μM era ridotto a livelli inferiori a 100μM.

Sono state impiegate tre tipologia di vasche per ciascuna specie, nelle quali erano trasferiti gli animali nello stesso numero e densità già descritti per lo stress da ipossia. L’adattamento era identico per le tre vasche e a quanto già riportato per lo stress ipossico. Il trattamento, invece, era come già descritto per lo stress da nitrito, con tre sottogruppi di animali, per entrambe le specie (controllo, vasca 10 e vasca 2). Alla fine del trattamento gli animali, di ciascun sottogruppo, erano sottoposti ad un protocollo di ipossia acuta identico a quanto descritto per lo stress da ipossia.

Durante il periodo di ipossia sono stati effettuati dei prelievi regolari di acqua per la determinazione dell’escrezione azotata. Alla fine del trattamento ipossico, gli animali sono stati sacrificati, come riportato negli appositi paragrafi, per il campionamento del sangue, per l’analisi del contenuto ematico di nitrito-N, urea-N e lattato, e del tessuto muscolare, per l’analisi del contenuto muscolare di nitrito-N, ammonio-N, urea-N, lattato e attività arginasi.

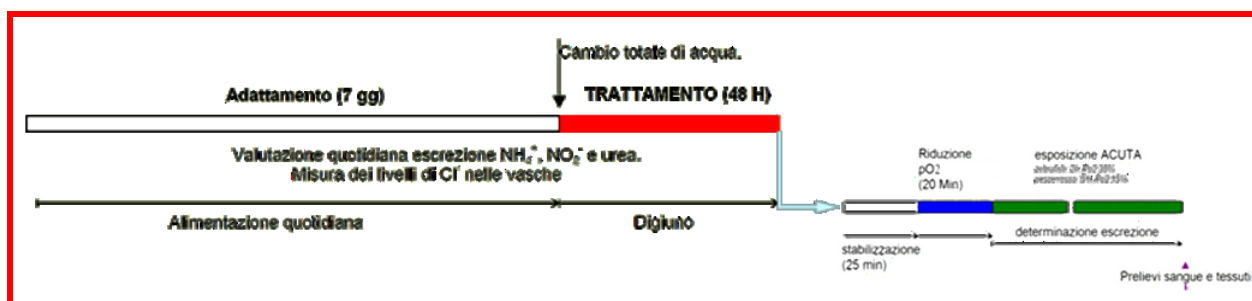


Figura 3.14 - Schema descrittivo del protocollo sperimentale “stress combinato da nitrito seguito ad trattamento acuto di ipossia”.

### 3.3.6 Composizione dell'acqua di fonte usata come base per la preparazione dell'acqua per le vasche

Per stabilire le concentrazioni dei principali ioni dell'acqua corrente dello stabulario del Dipartimento delle Scienze Biologiche, un campione di acqua è stato sottoposto ad analisi chimiche presso il laboratorio di Chimica del prof. Marco Trifuoggi. In tabella sono riportati gli ioni analizzati ( $\text{mg l}^{-1}$ ), (Tab. 3.2)

Tabella 3.2 – Principali ioni contenuti nell'acqua base (di fonte )

Parametro misurato	U.M.	Valori
Ioni bicarbonato [ $\text{HCO}_3^-$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	491.0
Ioni cloruro [ $\text{Cl}^-$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	49.0
Ioni solfato [ $\text{SO}_4^{2-}$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	41.2
Ioni sodio [ $\text{Na}^+$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	29.6
Ioni potassio [ $\text{K}^+$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	11.4
Ioni calcio [ $\text{Ca}^{2+}$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	126.0
Ioni ammonio [ $\text{NH}_4^+$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	< 0.02
Ioni magnesio [ $\text{Mg}^{2+}$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	28.9
Ioni nitrato [ $\text{NO}_3^-$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	18.9
Ioni nitrito [ $\text{NO}_2^-$ ]	$\text{mg l}^{-1}$	< 0.002
Durezza totale	$\text{mg l}^{-1}$	43.3

Partendo da questi dati, sono state decise le diluizioni dell'acqua di fonte riportate nei protocolli appositi, al fine di abbassare la durezza dell'acqua utilizzata per il trattamento degli animali, e ottenere concentrazioni di questi ioni, e in particolare, quella del cloruro, vicine a quelle riportate da Jensen (2007).

### 3.4 Statistica

I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM. L'ANOVA a due vie, con il Bonferroni post hoc test è stato utilizzato per il confronto tra le medie ( $p < 0.05$ ). Per i confronti relativi alla distribuzione percentuale delle diverse forme di emoglobina, è stata applicata ai dati la trasformazione in arcoseno della radice quadrata dei valori, al fine di normalizzare i dati prima dell'analisi statistica. L'analisi statistica è stata effettuata con il software GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).



## 4. Risultati

### 4.1 Livelli normali dei parametri valutati in pesce zebra

Nelle tabelle 4.1, 4.2 e 4.3 sono riportati i valori normali di: consumo di ossigeno di routine, attività di routine, escrezione azotata, livelli ematici e muscolari di ammonio-N, urea-N, lattato e nitrito. Tali valori risultano dalla media di tutti i valori di controllo misurati dai vari protocolli utilizzati per il presente studio.

In Fig. 4.1, sono invece riportati i livelli normali dell'arginasi e dei principali enzimi del ciclo dell'urea misurati nel tessuto muscolare di pesce zebra, in individui acclimatati a 27°C e non sottoposti ad alcuno stress. Si osserva che l'attività arginasica è quella più alta, mentre l'attività OTCasica è molto bassa. Appare interessante notare, tuttavia, l'elevata attività della ASS (arginino succinato sintasi), sebbene con levata variabilità, indicata dall'elevato valore dell'SEM.

**Tabella 4.1**

**Valori normali (Media di  $\pm$  SEM, N=15) consumo di ossigeno di routine ( $rMO_2$ ) ed escrezione azotata in pesce zebra**

$rMO_2$	Attività	Escrezione ammonio-N	Escrezione urea-N
$mgO_2\ h^{-1}\ kg^{-1}$	Virate $min^{-1}$	$mmol-N-NH_3/h/kg$	$mmol-N-ureico/h/kg$
$492.58 \pm 52.76$	$17.53 \pm 0.41$	$2.41 \pm 0.33$	$1.70 \pm 0.11$

**Tabella 4.2**

**Livelli ematici normali di ammonio-N, urea-N, nitrito-N e lattato in pesce zebra. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni.**

Ammonio-N	Urea-N	Nitrito-N	Lattato
$\mu mol-N\ ml^{-1}$	$\mu mol-N\ ml^{-1}$	$\mu mol-N\ ml^{-1}$	$\mu mol\ ml^{-1}$
$0.12 \pm 0.06$	$62.32 \pm 15.07$	$0.049 \pm 0.013$	$6.77 \pm 1.89$

**Tabella 4.3**

**Livelli muscolari normali di ammonio-N, urea-N, nitrito-N e lattato in pesce zebra. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni.**

Ammonio-N	Urea-N	Nitrito-N	Lattato
$\mu mol-N\ g(tessuto)^{-1}$	$\mu mol-N\ g(tessuto)^{-1}$	$\mu mol-N\ g(tessuto)^{-1}$	$\mu mol\ g^{-1}\ tessuto$
$0.018 \pm 0.001$	$0.59 \pm 0.04$	$0.90 \pm 0.31$	$36.80 \pm 1.91$

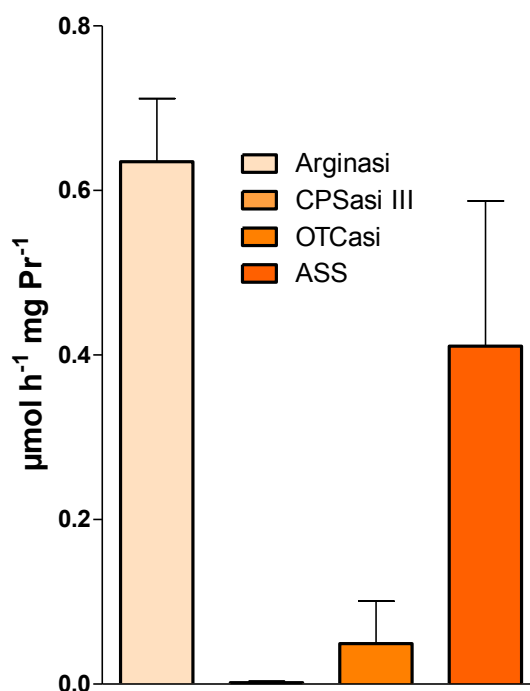


Fig. 4.1 -Attività dell'arginasi e degli enzimi del ciclo dell'urea in omogenato di muscolo di pesce zebra. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni.

#### 4.2 Effetto di variazioni acute di salinità su $rMO_2$ , attività e escrezione azotata in pesce zebra e gambusia

È stato valutato l'effetto sul metabolismo di routine e sull'escrezione azotata dell'aumento acuto della salinità ai seguenti livelli di: 10‰, 20‰ (pesce zebra e gambusia), 25‰ (pesce zebra), e 30‰ e 35‰ (gambusia) alla temperatura di acclimatazione (27°C). I risultati sono riportati nelle Fig. 4.2 e 4.3. I valori dei vari parametri determinati sono stati comparati al controllo (salinità 0‰). In particolare, mediante ANOVA a due vie con il Bonferroni post hoc test, sono state valutate sia i possibili effetti della salinità che le differenze di specie sui seguenti parametri: consumo di ossigeno,  $rMO_2$ , attività di routine, virate al minuto, ed escrezione di azoto ammoniacale ( $M_{amm-N}$ ) ed azoto ureico ( $M_{urea-N}$ ).

I valori di controllo di  $rMO_2$  sono molto diversi per le due specie:  $\sim 500 \text{ mg-O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$  per pesce zebra e  $\sim 250\text{-}300 \text{ mg-O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$  per gambusia (Fig. 4.2). In pesce zebra i livelli di  $rMO_2$  si mantengono superiori a quelli della gambusia a tutte le salinità testate. E', inoltre, evidente che, mentre per il pesce zebra, l'aumento acuto di salinità ha scarsi effetti sull' $rMO_2$  (le differenze osservate non sono significative), in gambusia l'aumento acuto della salinità porta ad un incremento di questo parametro che risulta significativo a 20‰ ( $P < 0.05$ ). In parallelo, tuttavia, si osserva, in entrambe le specie, un aumento significativo dell'attività di routine, che, in pesce zebra raggiunge il massimo al 10‰, per poi diminuire alle salinità maggiori, mentre in gambusia

si mantiene alta fino al 30‰ per poi diminuire in modo non significativo alla massima salinità testata (35‰).

I livelli di escrezione di azoto ammoniacale sono comparabili nelle due specie:  $\sim 1\text{-}1.5 \text{ mmol-N h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  (Fig. 4.3). In pesce zebra, l'  $M_{\text{amm-N}}$  risulta massima nella condizione 10‰ per poi diminuire alle salinità più alte. In gambusia, invece, l'  $M_{\text{amm-N}}$  aumenta significativamente ( $P < 0.05$ ) solo alla massima salinità 35‰.

I livelli di escrezione di azoto ureico sono significativamente diversi nelle due specie:  $\sim 2 \text{ mmol-N h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$  in pesce zebra, mentre molto bassi in gambusia  $< 1 \text{ mmol-N h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ . In pesce zebra l'  $M_{\text{urea-N}}$  rimane pressoché costante durante l'aumento acuto della salinità, anche alle salinità più alte, mentre in gambusia l'aumento acuto della salinità porta ad una crescente escrezione di azoto ureico da con livelli significativi aumentati a 20‰-35‰ ( $P < 0.05$ ); alla massima salinità,  $M_{\text{urea-N}}$  è  $\sim 40$  volte più alta rispetto ai controlli.

#### ***4.3 Effetto dell'abbassamento acuto della temperatura su $r\text{MO}_2$ , attività e escrezione azotata in pesce zebra e gambusia***

L'effetto sul metabolismo di routine e sull'escrezione azotata dell'abbassamento acuto della temperatura da 27°C (temperatura di acclimatazione) a 20 °C è stato valutato in pesce zebra e gambusia. I risultati sono riportati nelle Figure 4.4 e 4.5. I valori dei vari parametri determinati sono stati comparati al controllo condotto alla temperatura di 27 °C. In particolare, mediante ANOVA a due vie con il Bonferroni post hoc test, sono state valutate sia i possibili effetti della temperatura che le differenze di specie sui seguenti parametri: consumo di ossigeno,  $r\text{MO}_2$ , attività di routine, virate al minuto, ed escrezione di azoto ammoniacale ( $M_{\text{amm-N}}$ ) ed azoto ureico ( $M_{\text{urea-N}}$ ).

L'abbassamento acuto della temperatura comporta in pesce zebra una riduzione non significativa dell'  $r\text{MO}_2$ , che è associata ad una riduzione significativa dell'attività di routine ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4.4). In gambusia, invece, si osserva un aumento non significativo dell'  $r\text{MO}_2$ , probabilmente legato al notevole aumento dell'attività di routine da  $\sim 2 \text{ virate min}^{-1}$  a  $\sim 10 \text{ virate min}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ).

L'abbassamento acuto della temperatura porta ad un'escrezione di azoto ammoniacale molto diversa nelle due specie (Fig. 4.5). Infatti, in gambusia, e non in pesce zebra, l'  $M_{\text{amm-N}}$  si riduce fortemente ( $P < 0.05$ ) da  $\sim 1 \text{ mmol-N h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$  a  $0.5 \text{ mmol-N h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ . L'  $M_{\text{urea-N}}$ , molto diversa nelle due specie a 27 °C ( $P < 0.05$ ), non varia con l'abbassamento della temperatura in pesce zebra, mentre aumenta significativamente in gambusia da  $\sim 0.5 \text{ mmol-N h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$  a  $\sim 2 \text{ mmol-N h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ .

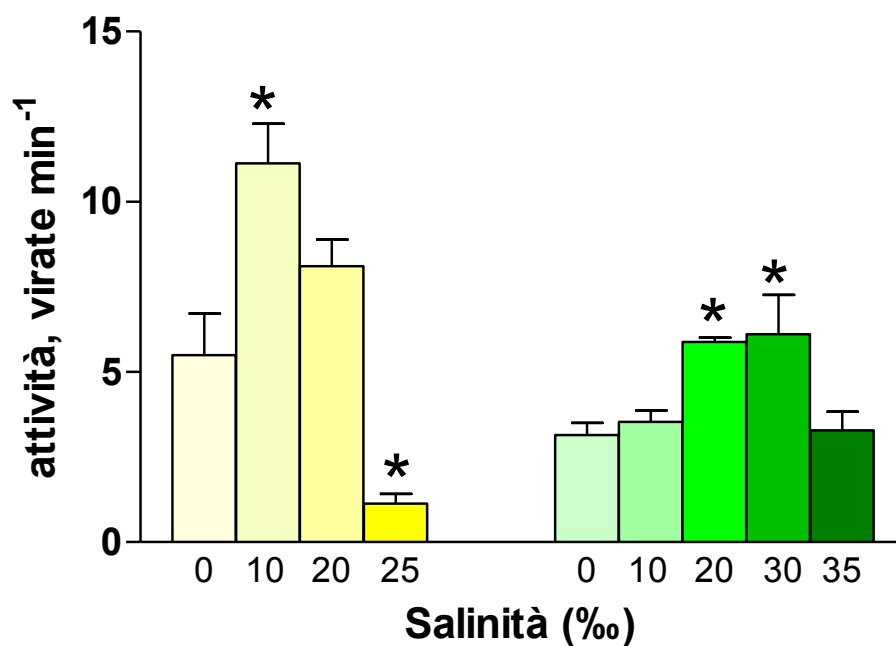
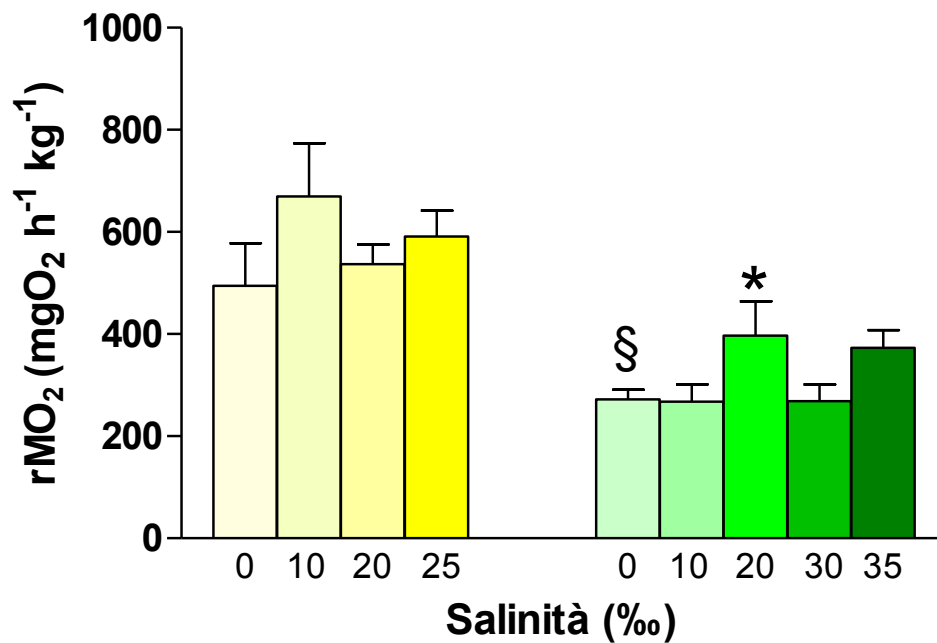


Figura 4.2 - Effetto di un aumento acuto della salinità ambientale sul consumo di ossigeno di routine ( $rMO_2$ ) in pesce zebra (■) e gambusia (■). L'attività di routine degli animali (virate al  $min^{-1}$ ) durante il periodo di misura è anche riportata. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e gambusia a salinità 0‰; \* differenza significativa rispetto a salinità 0‰, nell'ambito di ciascuna specie.

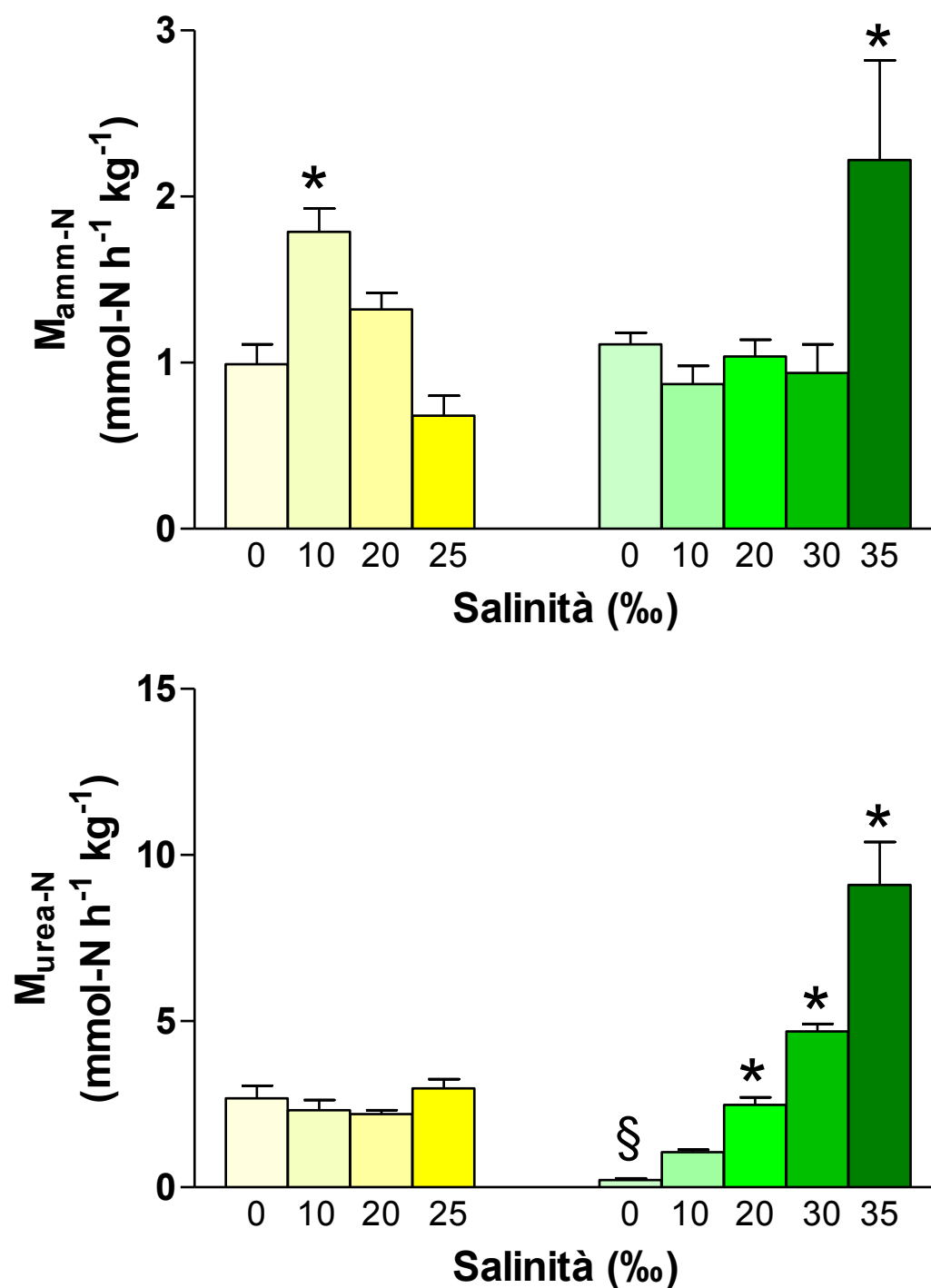


Figura 4.3 - Effetto di un aumento acuto della salinità ambientale sulla velocità di escrezione di azoto ammoniacale ( $M_{amm-N}$ ) ed azoto ureico ( $M_{urea-N}$ ) in pesce zebra (■) e gambusia (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e gambusia a salinità 0‰; \* differenza significativa rispetto a salinità 0‰, nell'ambito di ciascuna specie.

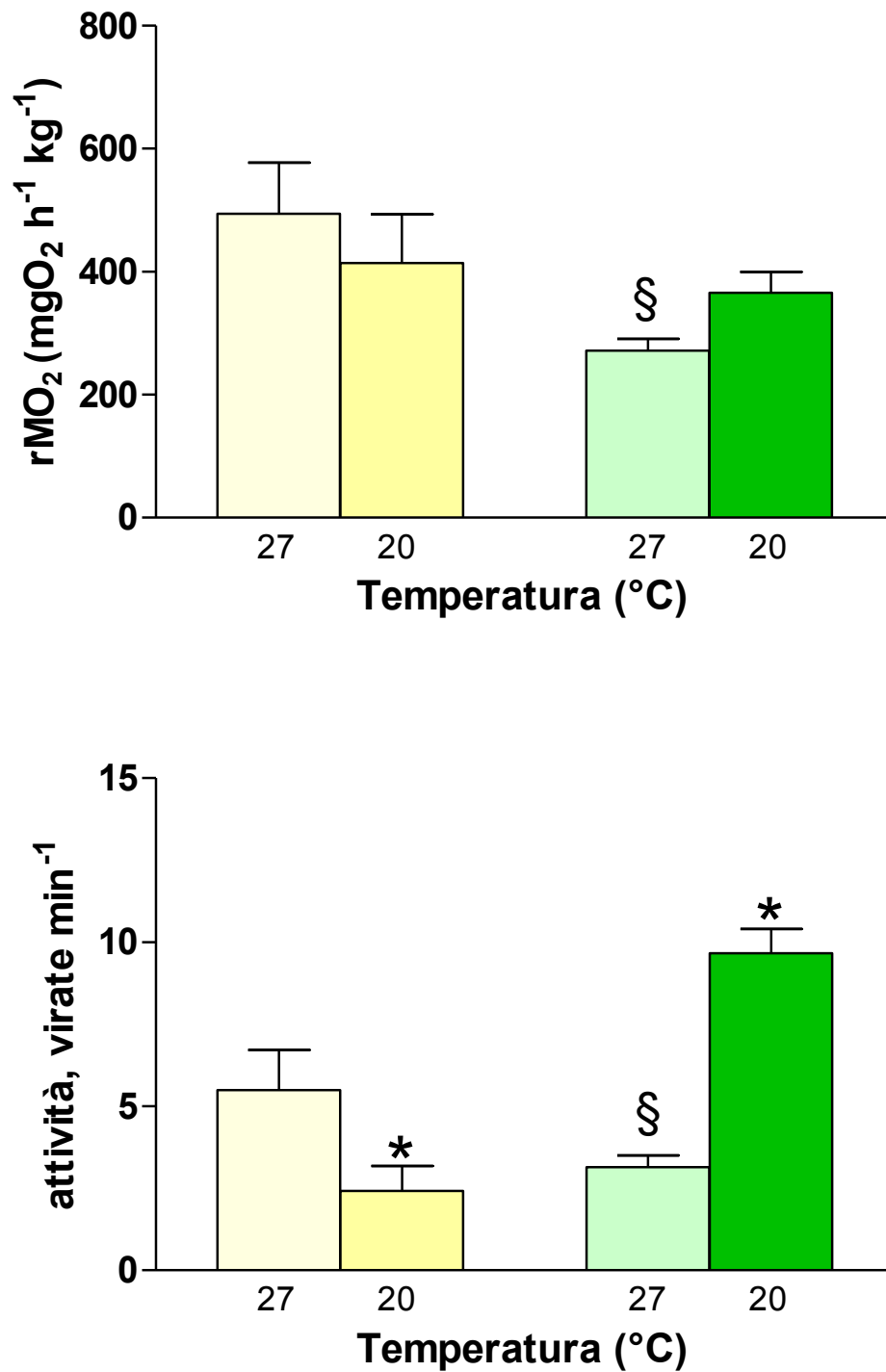


Figura 4.4 - Effetto di una diminuzione acuta della temperatura ambientale (da 27°C, temperatura di acclimatazione, a 20°C) sul consumo di ossigeno di routine (rMO<sub>2</sub>) in pesce zebra (■) e gambusia (■). L'attività spontanea degli animali durante il periodo di misura è anche riportata (virate al min<sup>-1</sup>). I valori sono la media ± SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e gambusia; \* differenza significativa rispetto a 27°C, nell'ambito di ciascuna specie.

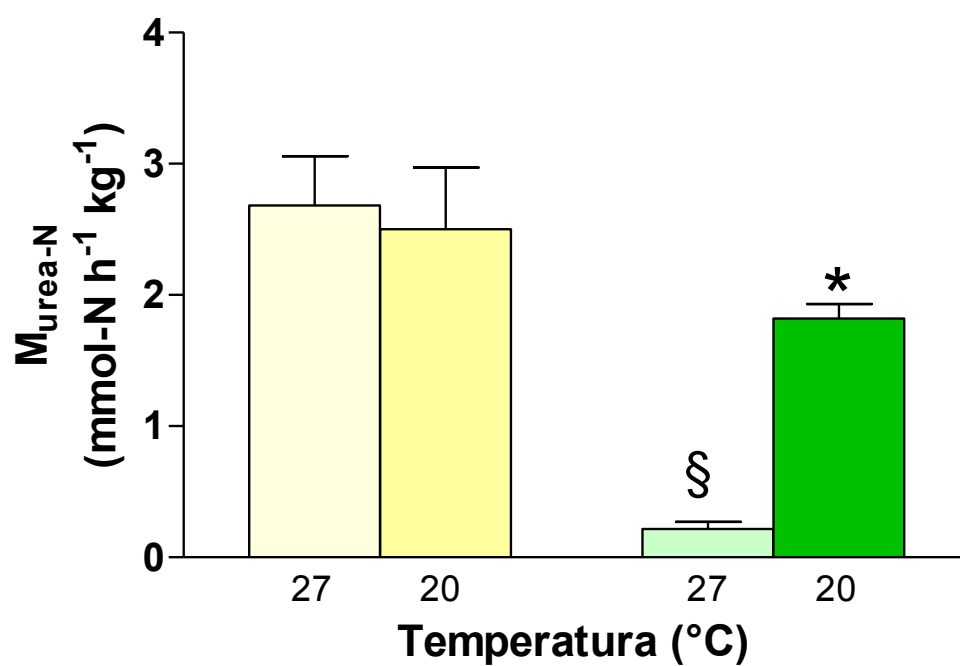
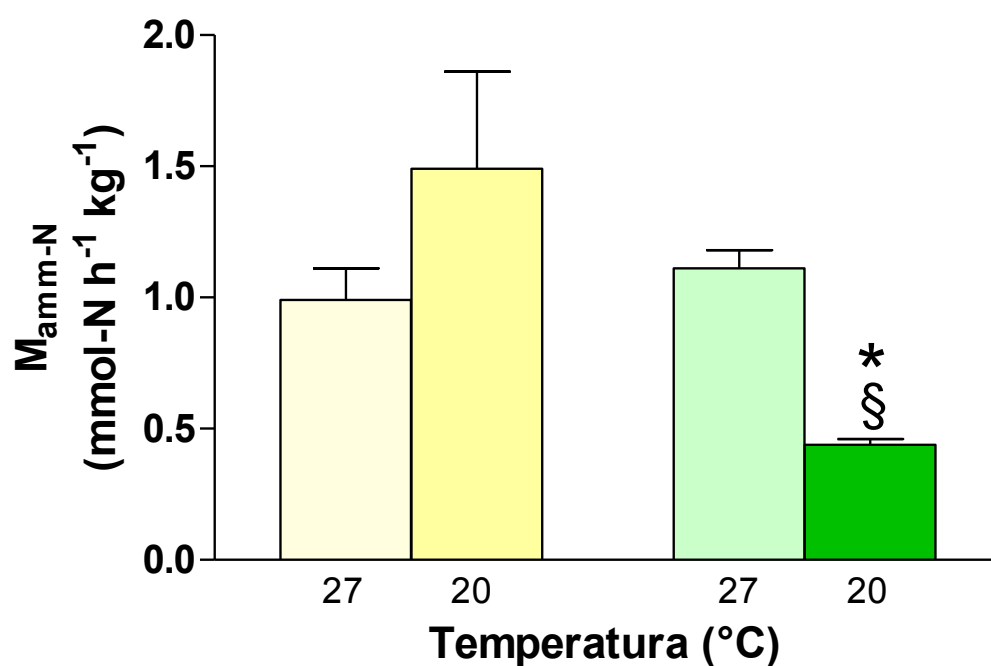


Figura 4.5 - Effetto di una diminuzione acuta della temperatura ambientale (da 27 $^{\circ}\text{C}$ , temperatura di acclimatazione, a 20 $^{\circ}\text{C}$ ) sulla velocità di escrezione di azoto ammoniacale ( $M_{amm-N}$ ) ed azoto ureico ( $M_{urea-N}$ ) in pesce zebra (■) e gambusia (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e gambusia; \* differenza significativa rispetto a 27 $^{\circ}\text{C}$ , nell'ambito di ciascuna specie.

#### **4.4 Effetto di variazioni acute di salinità e temperatura su $rMO_2$ , attività e escrezione azotata in pesce zebra e gambusia**

In pesce zebra e gambusia, è stato valutato l'effetto dell'aumento acuto alla massima salinità testata negli esperimenti di stress osmotico (25‰ per il pesce zebra e 35‰ per gambusia), simultaneo ad un abbassamento della temperatura da quella acclimatazione (27°C) a 20°C. E' stata effettuata un'analisi mediante ANOVA a due vie, seguita da Bonferroni post hoc test, per valutare le possibili differenze dovute al doppio stress (osmotico e termico), nonché le differenze di risposta tra le due specie.

Sono stati valutati i seguenti parametri misurati:  $rMO_2$ , attività, escrezione di ammonio ed urea.

In pesce zebra (Fig. 4.6) la diminuzione acuta della temperatura simultaneamente all'aumento acuto di salinità inducono una riduzione significativa nell' $rMO_2$  ( $p<0.05$ ). L'attività di routine aumenta significativamente quando vengono combinati i due stress, con una differenza significativa ( $p<0.05$ ) sia rispetto ai controlli a 20°C che rispetto ai trattati a 25‰.

L' $M_{amm-N}$  è influenzata solo dalla diminuzione della temperatura ( $p<0.05$ ) e non varia nei trattati a 25‰ rispetto a 27°C quando si associa anche lo stress termico. L' $M_{urea-N}$ , infine, si riduce significativamente ( $P<0.05$ ) quando sono combinati i due stress.

Anche in gambusia (Fig. 4.7), l' $rMO_2$  diminuisce significativamente quando i due stress sono combinati ( $p<0.01$ ), e tale variazione è associata anche ad una diminuzione significativa dell'attività di routine ( $p<0.01$ ). Infine, mentre non si osservano variazioni significative di  $M_{amm-N}$ , l'incremento di  $M_{urea-N}$  indotto dall'aumento di salinità risulta estremamente ridotto dalla combinazione con lo stress termico.



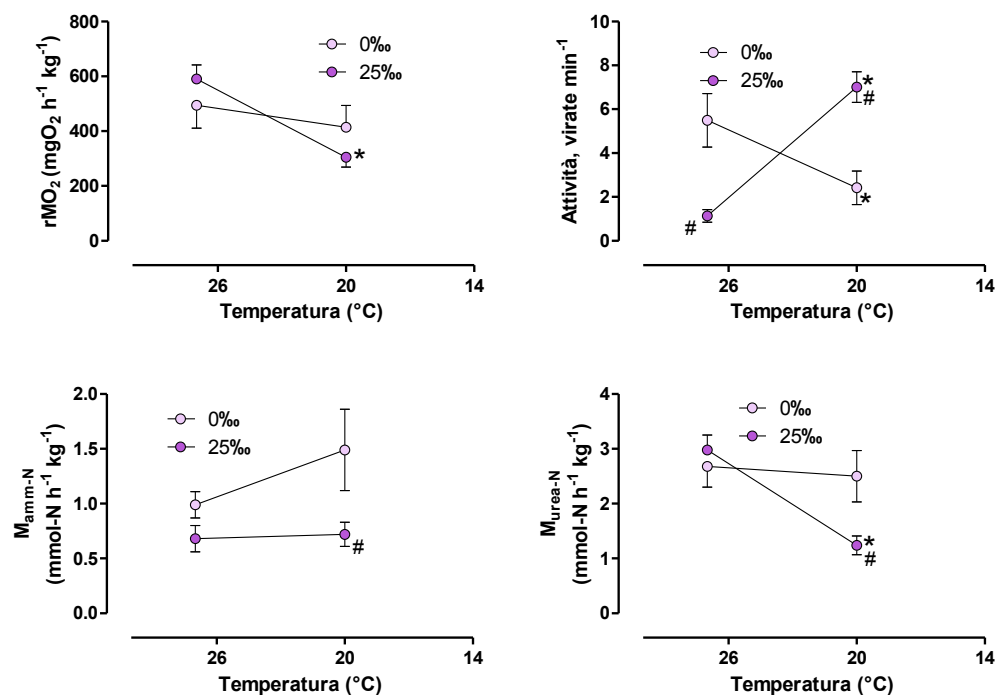


Figura 4.6 - Effetto di una diminuzione acuta della temperatura ambientale (da 27°C, temperatura di acclimatazione, a 20°C) in acqua dolce e alla salinità del 25 ‰ sul consumo di ossigeno di routine, sull'attività di routine, e sull'escrezione azotata in pesce zebra. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguito dal Bonferroni post-hoc test. # differenza significativa tra controllo e salinità 25‰ alla stessa temperatura; \* differenza significativa tra 27°C e 20 °C alla stessa salinità.

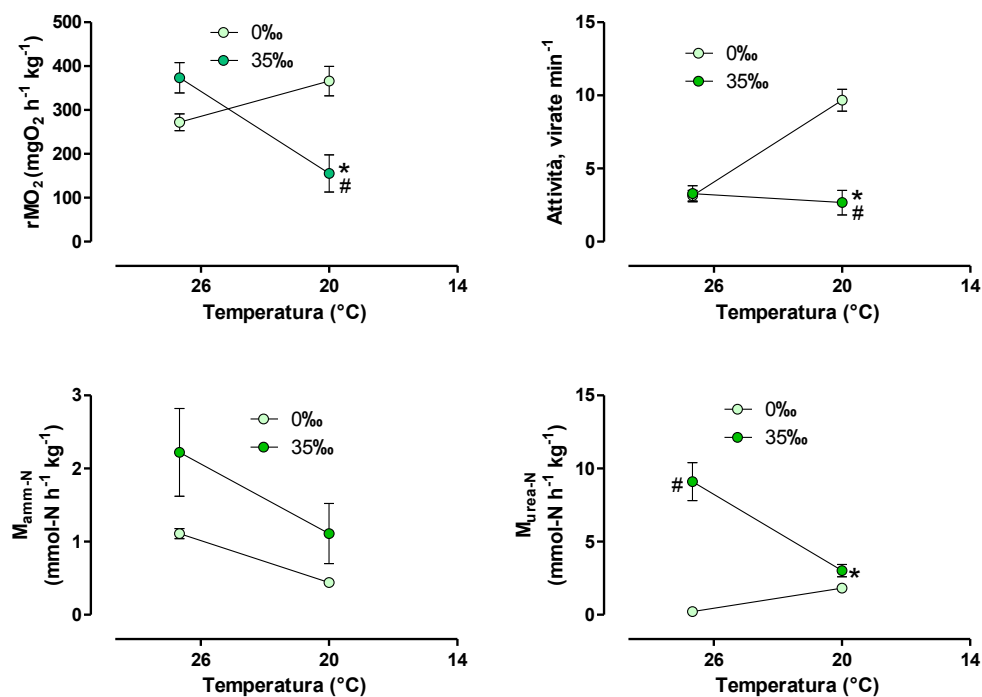


Figura 4.7 - Effetto di una diminuzione acuta della temperatura ambientale (da 27°C, temperatura di acclimatazione, a 20°C) in acqua dolce e alla salinità del 35 ‰ sul consumo di ossigeno di routine, sull'attività di routine, e sull'escrezione azotata in gambusia. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguito dal Bonferroni post-hoc test. # differenza significativa tra controllo e salinità 35‰ alla stessa temperatura; \* differenza significativa tra 27°C e 20 °C alla stessa salinità.

#### **4.5 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli di emoglobina, metaemoglobina e nitrosilemoglobina in pesce zebra e carassio dorato**

Sono stati valutati gli effetti del trattamento acuto (48h) a due concentrazioni ambientali di nitrito ambientale, concentrazione fisiologica (10 $\mu$ M) e concentrazione sub-letale (2mM) alle temperature di acclimatazione delle due specie, 27 °C per pesce zebra e 20 °C per il carassio dorato.

I livelli percentuali di ossiemoglobina (HbO<sub>2</sub>), metaemoglobina (metHb) e nitrosilemoglobina (HbNO) sono stati determinati nel sangue di pesce zebra e carassio dorato al termine dell'esposizione acuta di 48h alle due concentrazioni suddette (Fig. 4.8). I valori delle tre forme di emoglobina, espressi in % dell'emoglobina totale, sono stati comparati con un controllo, condotto in condizioni di assenza di nitrito. L'analisi è stata effettuata mediante ANOVA a due vie con Bonferroni post hoc test.

In assenza di nitrito ambientale, l'HbO<sub>2</sub> è la forma predominante in entrambe le specie (96.3% e 98.6% HbO<sub>2</sub> per pesce zebra e carassio dorato, rispettivamente). I livelli basali di metHb (1.33% e 3.3% per pesce zebra e carassio dorato, rispettivamente) e HbNO (0.05% e 0.34% per pesce zebra e carassio dorato, rispettivamente) sono leggermente più alti in pesce zebra, anche se non in maniera statisticamente significativa. Il trattamento con nitrito 10 $\mu$ M non induce variazioni significative nei livelli di HbO<sub>2</sub> in entrambe le specie. I valori di methHb restano bassi, mentre aumentano significativamente i livelli di HbNO in entrambe le specie ( $p < 0.05$ ), con un incremento maggiore in pesce zebra (4.93%) che in carassio dorato (2.68%). Il trattamento acuto alla concentrazione di 2mM porta ad una significativa ( $p < 0.01$ ) riduzione dei livelli di HbO<sub>2</sub> (~ 50%) in entrambe le specie; aumentano significativamente ( $p < 0.01$ ) i livelli percentuali di metHb (oltre il 40% dell'emoglobina totale) in entrambe le specie. L'HbNO aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) in entrambe le specie con livelli che anche in questo caso sono più alti in pesce zebra (11.5%) che in carassio dorato (4.31%).

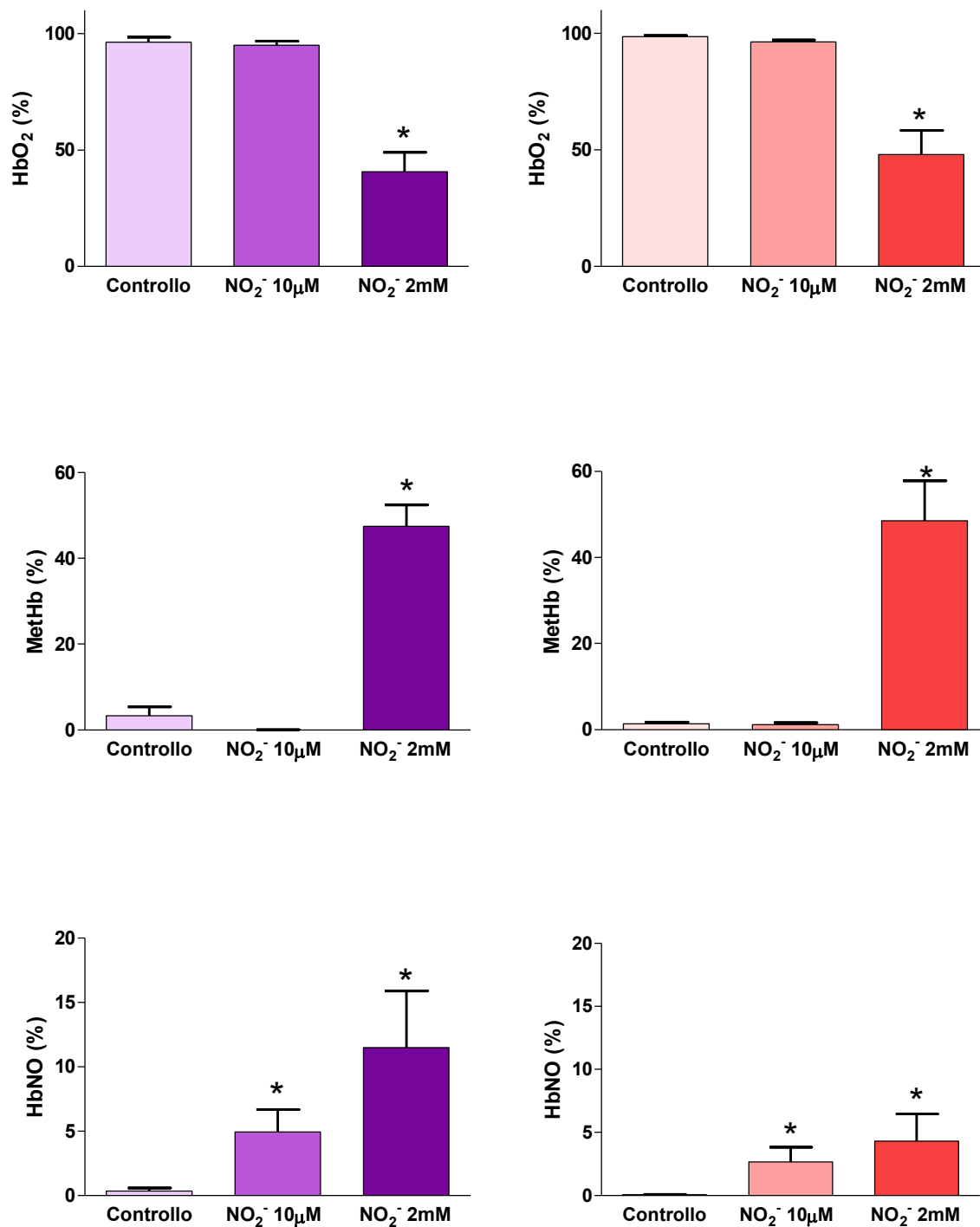


Figura 4.8 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10 μM e 2 mM sui livelli di HbO<sub>2</sub>, MetHb e HbNO in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media ± SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test, dopo la trasformazione in arcsen. \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

#### **4.6 Effetto acuto del nitrito ambientale sul consumo di ossigeno ed escrezione azotata in pesce zebra e carassio dorato**

E' stato valutato l'effetto 24 e 48 di trattamento acuto con nitrito ambientale ( $10\mu\text{M}$  e  $2\text{mM}$ ) su consumo di ossigeno ( $\text{rMO}_2$ ,  $\text{mg h}^{-1} \text{kg}^{-1}$ ), attività di routine ( $\text{virate min}^{-1}$ ), escrezione di ammonio-N ( $\text{mmol-N h}^{-1} \text{kg}^{-1}$ ) e urea-N ( $\text{mmol-N h}^{-1} \text{Kg}^{-1}$ ) in pesce zebra e carassio dorato. I valori di questi parametri sono stati confrontati con quelli ottenuti immediatamente prima del trattamento (tempo 0). I gruppi trattati sono stati confrontati con gruppi di controllo in cui era assente il nitrito (trattamento simulato). E' stata effettuata un'analisi mediante ANOVA a due vie seguita dal Bonferroni post hoc test per valutare le possibili differenze tra i parametri nelle varie condizioni e tra le due specie.

In condizioni di controllo il pesce zebra, acclimatato a  $27^\circ\text{C}$ , mostra un  $\text{rMO}_2$  più alto ( $\sim 500 \text{mg h}^{-1} \text{Kg}^{-1}$ ) rispetto al carassio dorato, acclimatato a  $20^\circ\text{C}$  ( $\sim 300 \text{mg h}^{-1} \text{Kg}^{-1}$ ) (Fig 4.9). L'attività di routine non è determinabile in carassio dorato a causa del suo comportamento sedentario, mentre in pesce zebra era di  $\sim 5 \text{virate min}^{-1}$ .

In pesce zebra l'esposizione acuta a nitrito  $10\mu\text{M}$  porta ad un aumento immediato (24h) nell' $\text{rMO}_2$ , che diventa significativo ( $p < 0.05$ ) a 48h. La concentrazione  $2\text{mM}$ , invece, non influenza l' $\text{rMO}_2$  durante tutto il periodo di esposizione. In carassio dorato il nitrito non influenza l' $\text{rMO}_2$ , che rimane pressoché stabile durante le 48h di trattamento.

Dall'analisi della velocità di escrezione di ammonio-N (determinata nel respirometro, simultaneamente alla determinazione del consumo di ossigeno) (Fig.4.10) è emerso, nelle due specie, un quadro molto complesso con una tendenza a diminuire con il tempo di trattamento in pesce zebra e con forti oscillazioni intorno allo zero in carassio dorato. In particolare, l'escrezione così determinata risulta, in entrambe le specie, molto diversa nei tre sottogruppi (controllo, vasca 10 e vasca 2) già a tempo 0, rendendo queste misure inaffidabili.

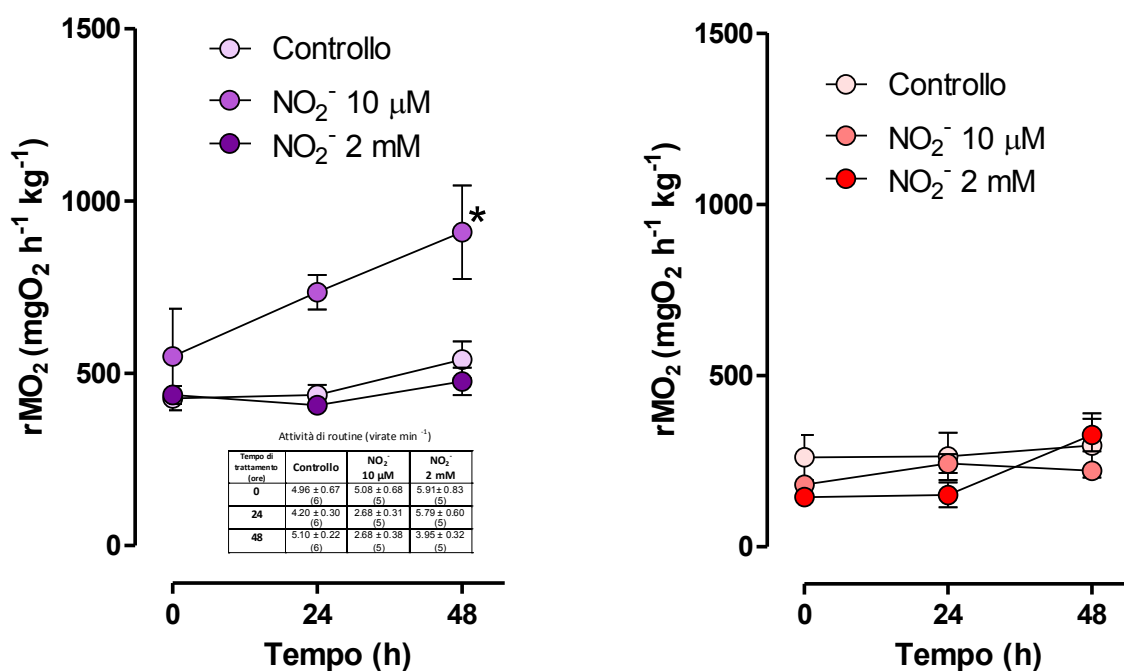


Figura 4.9 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10μM e 2mM sul consumo di ossigeno (rMO<sub>2</sub>) in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media ± SEM di 5-6 determinazioni. In pesce zebra un' evidente attività di routine era osservata e valutata in termini di virate min<sup>-1</sup>; i dati relativi sono riportati nella tabella inserita nel grafico di sinistra. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. \* differenza significativa rispetto al tempo 0 e rispetto al gruppo di controllo.

Pere tale motivo, l'escrezione di ammonio-N è stata valutata anche come escrezione media nelle vasche durante il periodo di trattamento, misurando l'accumulo di ammonio-N nella vasche stesse dopo 24 e 48 ore. I risultati, riportati in Fig. 4.11, indicano che l'escrezione di azoto ammoniacale è scarsamente influenzata dal trattamento con nitrito ad entrambe le concentrazioni e in entrambe le specie.

La misura dell'escrezione di urea-N durante il consumo di ossigeno è risultata più affidabile (Fig. 4.10). In pesce zebra, l'escrezione di nurea-N aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ), già alla concentrazione di nitrito ambientale di 10μM, sia a 24 che 48h, raggiungendo livelli di 2-3 mmol-N h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> a fine trattamento. In carassio dorato, invece, solo il trattamento alla concentrazione 2 mM induce un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) nell'escrezione di urea-N, che rimane tuttavia inferiore a 1 mmol-N h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>. La tendenza dell'escrezione ureica ad aumentare in

presenza di nitrito ambientale, con un'escrezione significativamente maggiore in pesce zebra che in carassio dorato, è stata confermata dai valori di escrezione media nelle vasche durante il periodo di trattamento (escrezione calcolata dai dati di accumulo di urea-N nella vasche dopo 24 e 48 ore).

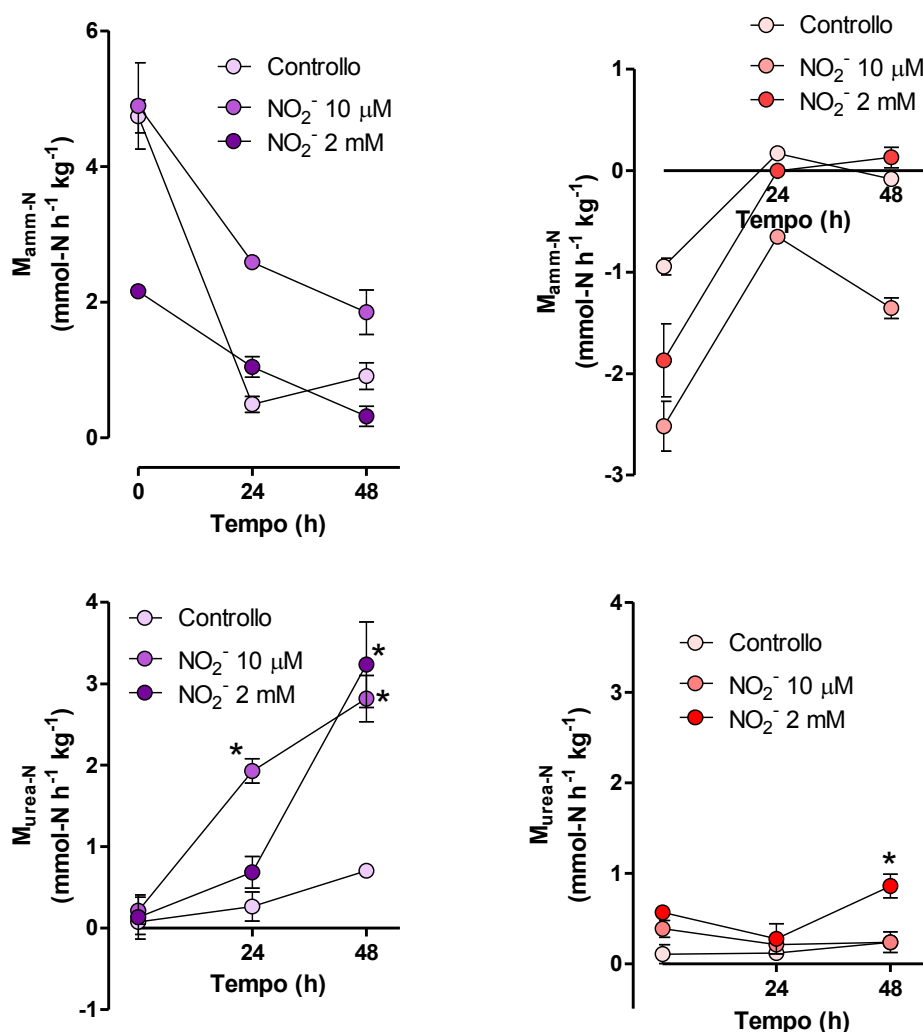


Figura 4.10 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10μM e 2mM sull'escrezione azotata (azoto ammoniacale, Mamm, in alto, e azoto ureico, Murea, in basso) in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). Le determinazioni erano effettuate nel respirometro in concomitanza con la misura del consumo di ossigeno. I valori sono la media ± SEM di 5-6 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. Mamm: Poiché l'analisi ha indicato differenza significativa fra i gruppi già a tempo 0 ( $p < 0.05$ ), la comparazione fra i gruppi relativamente al trattamento è stata tralasciata. Murea, pesce zebra: l'asterisco indica differenza significativa rispetto al tempo 0 e rispetto al gruppo di controllo.

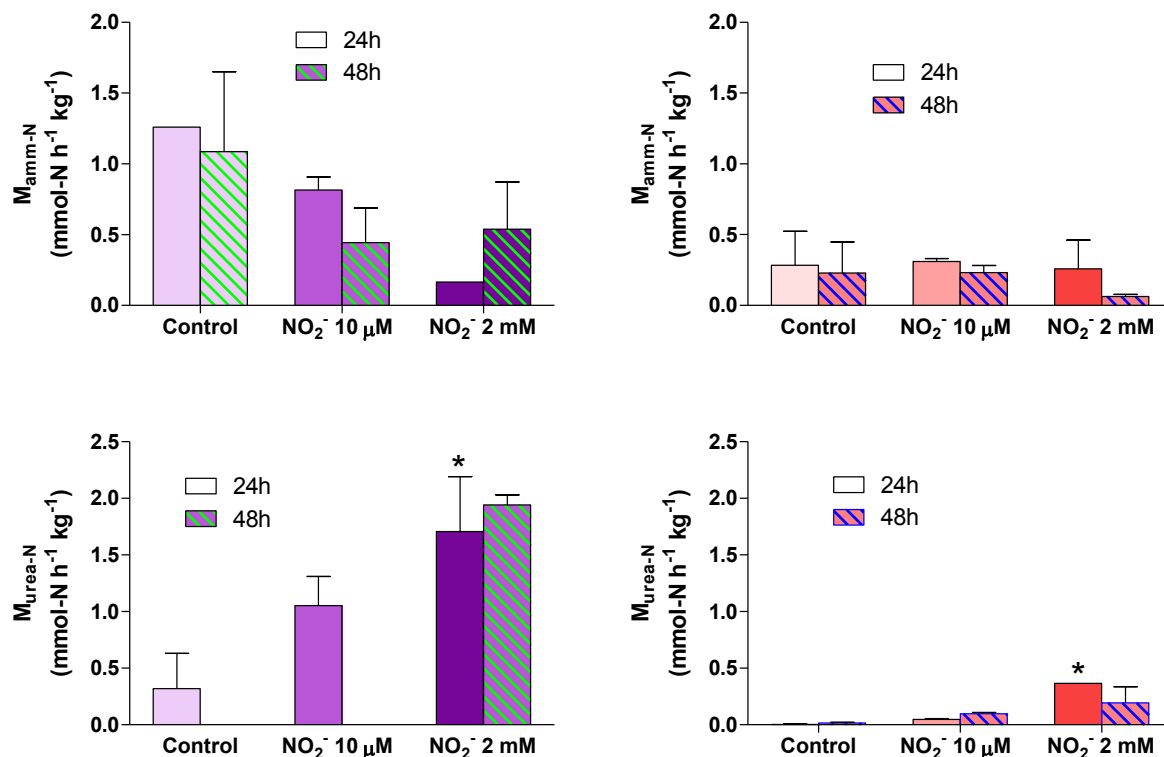


Figura 4.11 - Effetto del trattamento acuto (48 h) con nitrito 10  $\mu\text{M}$  e 2 mM sull'escrezione sull'escrezione azotata (azoto ammoniacale, Mamm, in alto, e azoto ureico, Murea, in basso) in pesce zebra (■) e carassio dorato (■), determinata sulla base dell'accumulo di queste sostanze nelle vasche di trattamento dopo 24 e 48 ore. Riguardo allo pesce zebra, dati di Murea a 48h sono disponibili solo per il gruppo trattato 2 mM. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 2-4 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test, tranne per Murea in pesce zebra, 24h, dove è stata utilizzata l'ANOVA a 1 via, seguita dal Bonferroni post-hoc test. Mamm: non sono risultate differenze significative. Murea: l'asterisco indica differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

#### 4.7 Effetto acuto del nitrito ambientale sul contenuto proteico del tessuto muscolare in pesce zebra e carassio dorato

Come si vede dai risultati riportati in Fig. 4.12, il contenuto proteico del tessuto muscolare di pesce zebra non è stato influenzato dal trattamento acuto con nitrito. In carassio dorato, invece, si osserva una riduzione che diventa statisticamente significativa in carassio dorato nei trattati con nitrito 2 mM. Pertanto tutti dati relativi al tessuto muscolare sono riportati sia in termini di g di tessuto, che per mg di proteine.

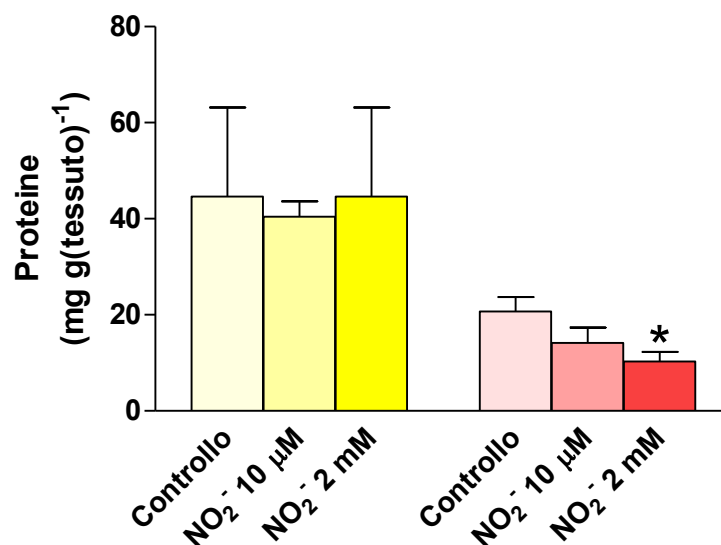


Figura 4.12 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10μM e 2mM sui livelli di proteine muscolari in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media ± SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

#### **4.8 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli di nitrito, lattato ed urea nel sangue e nel tessuto muscolare in pesce zebra e carassio dorato**

I livelli di nitrito-N, lattato, ammonio-N ed urea-N nel sangue e nel tessuto muscolare sono stati determinati in pesce zebra e carassio dorato in seguito ad esposizione acuta per 48h a due concentrazioni di nitrito ambientale, 10 μM e 2 mM (Fig. 20). I valori ematici sono stati espressi in mmol l<sup>-1</sup> (mM), mentre quelli muscolari sono stati espressi sia per g di tessuto che per mg di proteine, e sono stati comparati con un controllo (simulazione di trattamento). Le differenze fra i trattamenti e tra le specie sono state analizzate mediante ANOVA a due vie con Bonferroni post hoc test.

L'esposizione acuta alla concentrazione di nitrito 2 mM porta ad un aumento considerevole nei livelli nitrito-N nel sangue sia in pesce zebra che in carassio dorato. I livelli, comunque, rimangono molto inferiori a quelli ambientali e sono molto più alti in pesce zebra (~0.4 mM) che in carassio dorato (~0.1 mM). In pesce zebra l'accumulo di nitrito.N si osserva anche nel muscolo, dove risulta



significativamente aumentato già in presenza di nitrito ambientale 10  $\mu\text{M}$  (indicando una capacità di accumulo in queste condizioni) e rimane pressoché dello stesso ordine di grandezza anche in presenza di nitrito ambientale 2 mM. In carassio dorato il trattamento alla concentrazione 10 $\mu\text{M}$  non ha effetti sul livello di nitrito muscolare, che, invece, in seguito all'esposizione a nitrito 2 mM, aumenta fino a livelli doppi ( $\sim 400 \text{ nmol g(tessuto)}^{-1}$ ) rispetto al pesce zebra.

In pesce zebra, il lattato ematico (Fig. 4.14) aumenta con il trattamento già in presenza di nitrito ambientale 10  $\mu\text{M}$ , ma diventa significativo ( $P < 0.05$ ) solo in presenza di nitrito 2 mM. In carassio dorato, invece, si osserva un aumento in presenza di nitrito ambientale 2mM, che tuttavia non risulta statisticamente significativo. Nel muscolo di pesce zebra aumenta significativamente la produzione di lattato in presenza di nitrito 2 mM, mentre in carassio dorato l'aumento risulta significativo solo se il lattato è espresso per  $\text{mgPr}^{-1}$ .

Sia in pesce zebra che in carassio dorato non si osservano variazioni significative dei livelli di ammonio-N ematico in seguito al trattamento con nitrito (Fig. 4.15).

I livelli di urea-N ematici sono significativamente più bassi in carassio rispetto al pesce zebra. In carassio dorato questo parametro tende ad aumentare in seguito al trattamento con nitrito ambientale, ma questo effetto non è statisticamente significativo. In pesce zebra, l'urea-N ematica tende, invece, a diminuire in seguito al trattamento con nitrito 10  $\mu\text{M}$ , per poi aumentare significativamente con il trattamento con nitrito 2 mM (Fig. 4.15).

Non ci sono variazioni particolari riguardo ai livelli di azoto ammoniacale nel muscolo di pesce zebra, mentre in carassio si osserva aumento significativo nei trattati a 10  $\mu\text{M}$ , e una diminuzione in quelli trattati con nitrito 2 mM.

Nel muscolo non si osservano variazioni significative dei livelli di urea-N in pesce zebra, sia nei trattati a 10  $\mu\text{M}$  che in quelli trattati a 2 mM. Interessante, invece, è l'aumento significativo osservato in carassio dorato, nei trattati a 2 mM quando l'urea-N è espressa per mg di proteine.

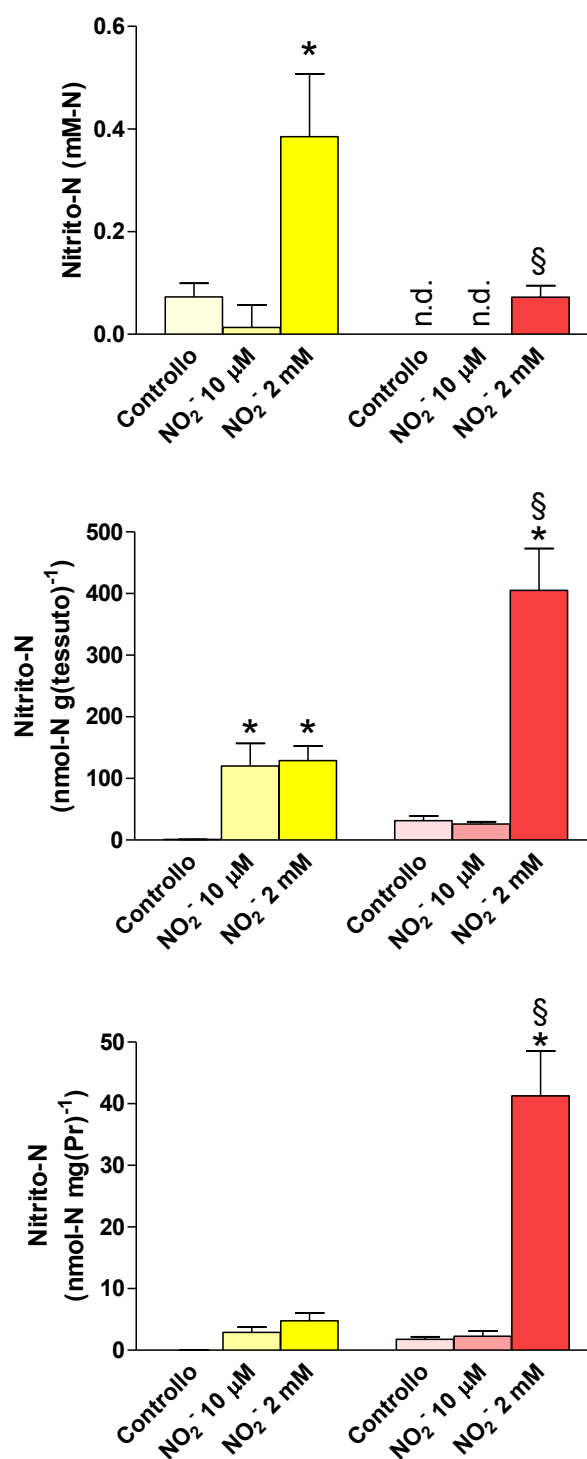


Figura 4.13 -. Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10μM e 2mM sui livelli di NO<sub>2</sub><sup>-</sup> nel sangue (grafico superiore) e nel muscolo (grafici intermedio e inferiore) di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I livelli muscolari sono espressi sia per g di tessuto che per mg di proteine. I valori sono la media ± SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

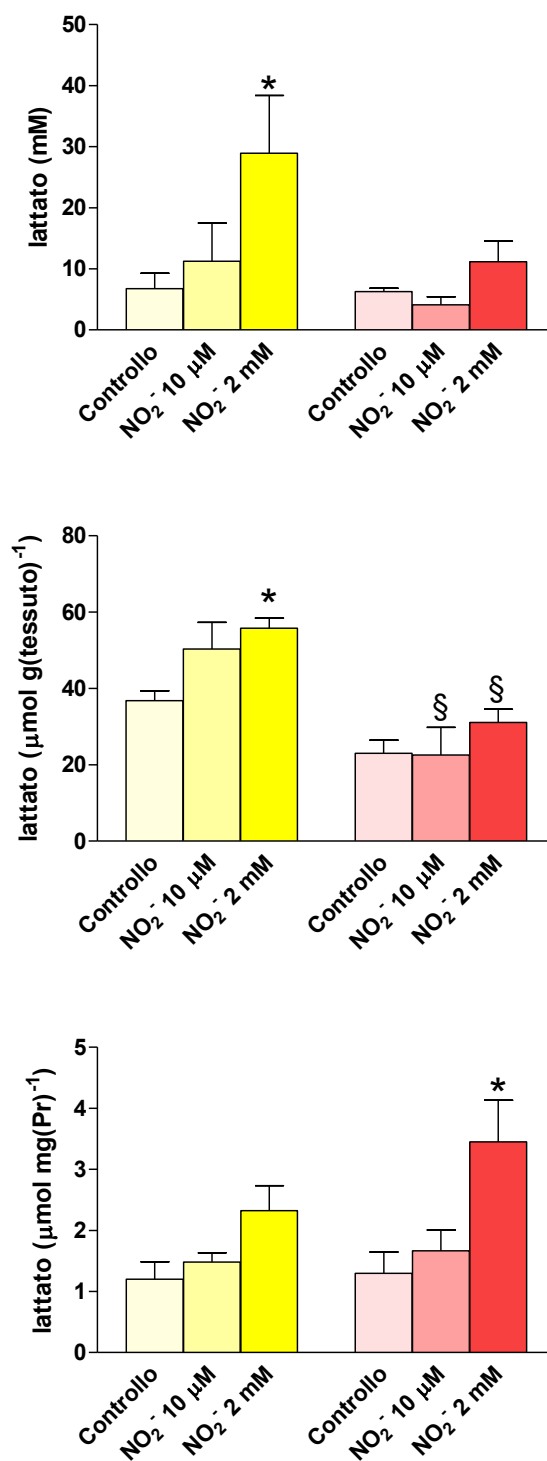


Figura 4.14 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10μM e 2mM sui livelli di lattato nel sangue e nel muscolo di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I livelli muscolari sono espressi sia per g di tessuto che per mg di proteine. I valori sono la media ± SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

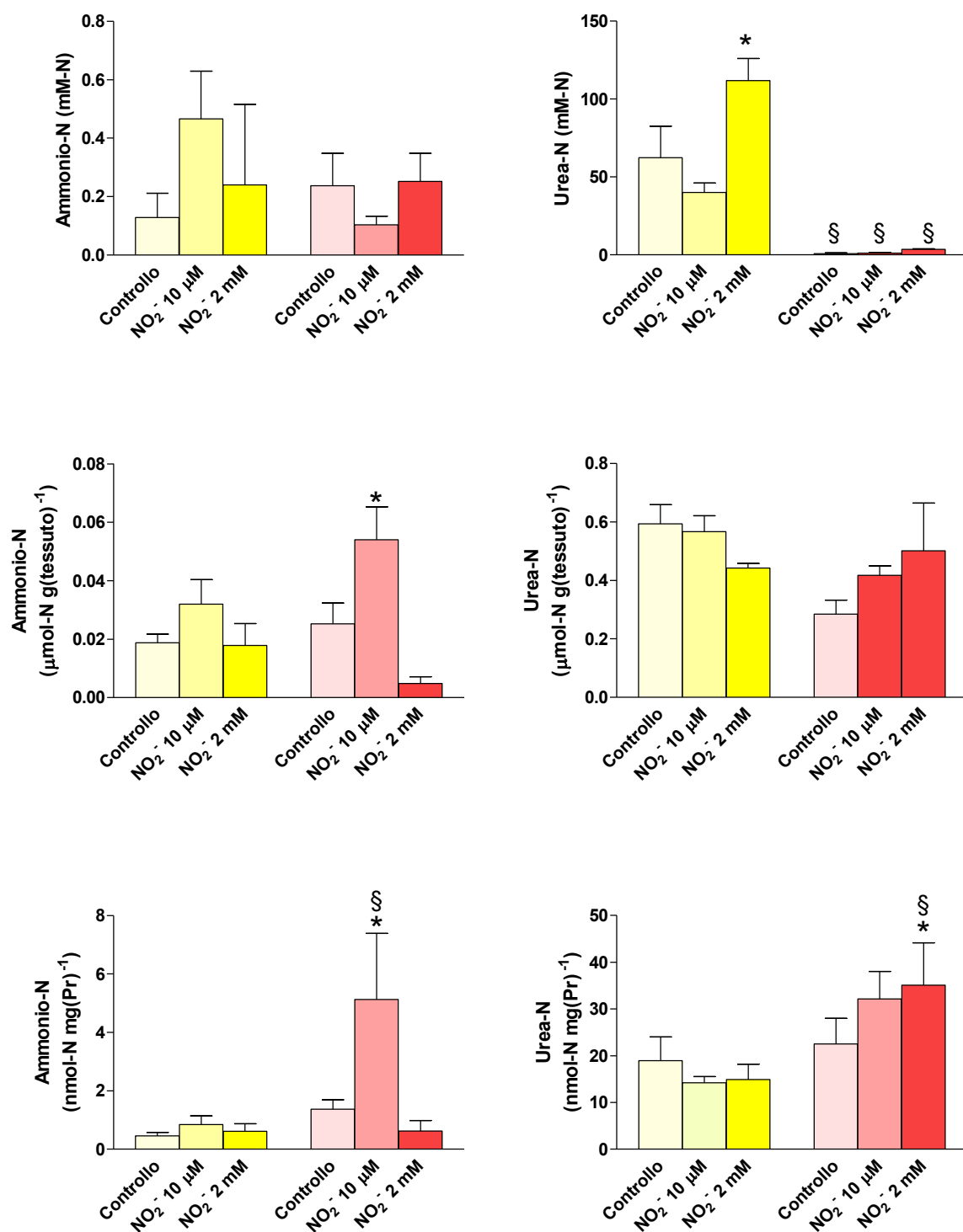


Figura 4.15 . Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10μM e 2mM sui livelli di ammonio-N e urea-N nel sangue e nel muscolo di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I livelli muscolari sono espressi sia per g di tessuto che per mg di proteine. I valori sono la media ± SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

#### **4.9 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli di arginasi muscolare e degli enzimi del ciclo dell'urea in pesce zebra e carassio dorato**

I livelli di arginasi muscolare sono stati determinati in pesce zebra e carassio dorato in seguito ad esposizione acuta per 48h a due concentrazioni di nitrito ambientale 10 $\mu$ M e 2mM. L'attività dell'enzima espressa come  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mgPr}^{-1}$  è stata comparata con un controllo, condotto in condizioni di assenza di nitrito. Le differenze fra i trattamenti e tra le specie sono state analizzate mediante ANOVA a due vie con Bonferroni post hoc test.

In condizioni di controllo mediamente il pesce zebra presenta un'attività arginasi maggiore che in carassio dorato. L'attività dell'enzima aumenta in entrambe le specie con una relazione non significativa a 10 $\mu$ M, mentre l'aumento nei trattati a 2mM è fortemente significativo ( $P < 0.001$ ) sia in pesce zebra che in carassio dorato con un incremento che è maggiore nel primo piuttosto che nel secondo Fig. 4.15.

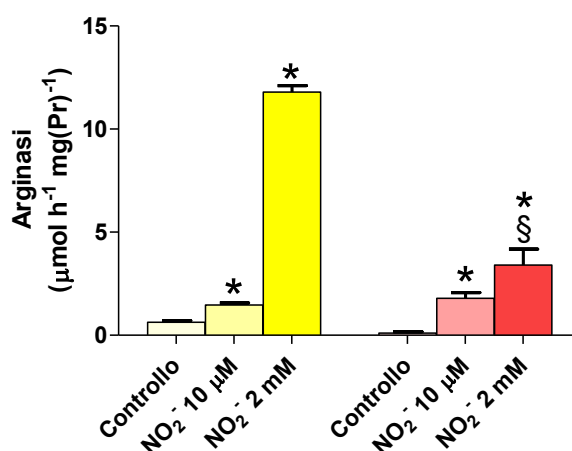


Figura 4.16 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10 $\mu$ M e 2mM sull'attività arginasi muscolare in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

#### **4.10 Effetto acuto del nitrito ambientale sui livelli degli enzimi del ciclo dell'urea in pesce zebra**

I livelli muscolari di alcuni enzimi del ciclo dell'urea (Carbamil fosfato sintetasi III (CPSasi III); Ornitina carbamil trasferasi (OTCasi;) e Arginina succinato sintetasi (ASS)) sono stati determinati in pesce zebra in seguito ad

esposizione acuta per 48h a due concentrazioni di nitrito ambientale, 10 $\mu$ M e 2mM (Fig. 4.17). L'attività, espressa come  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg(Pr)}^{-1}$  è stata comparata con quella di un gruppo controllo (simulazione di trattamento). Le differenze fra i trattamenti e tra le specie sono state analizzate mediante ANOVA a due vie con Bonferroni post hoc test.

L'attività dell'enzima CPSasi III, che comunque è molto bassa, aumenta nei trattati con nitrito, non presentando, tuttavia, variazioni significative. Per quanto riguarda l'attività dell'enzima OCTasi, si osserva una differenza significativa tra i trattati a 2 mM rispetto al gruppo dei trattati con nitrito 10 $\mu$ M. L'attività dell'enzima ASS, molto alta nei controlli, si riduce significativamente nei trattati a 10 $\mu$ M e 2mM.

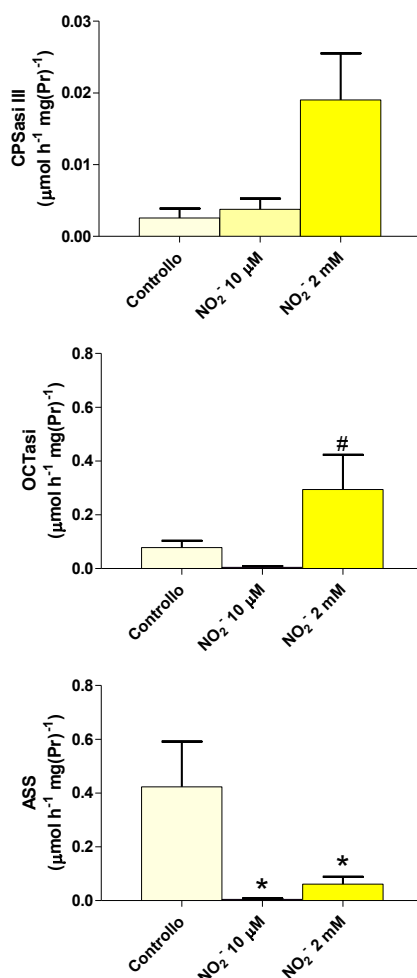


Figura 4.17 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10 $\mu$ M e 2mM sull'attività muscolare di CPSasi III, OCTasi e ASS in pesce zebra. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. # differenza significativa tra i gruppi trattati con nitrito 10  $\mu$ M e quelli trattati con nitrito 2 mM; \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

#### 4.11 Effetto dell'ipossia acuta sull'escrezione di ammonio ed azoto ureico in pesce zebra e carassio dorato

Nel corso dello studio è stata anche valutata l'entità dell'escrezione di ammonio-N e urea-N durante il trattamento ipossico.

In condizioni di ipossia, dovendo mantenere costante il livello di ossigeno ambientale, non è stato possibile misurare il consumo di ossigeno. L'attività degli animali in ipossia si riduce a livelli non significativamente diversi da 0 (pesce zebra) o è assente (carassio dorato).

Come illustrato in Fig. 4.18, in normossia le due specie presentano tassi di escrezione di ammonio-N significativamente diversi. L'abbassamento acuto di ossigeno porta una riduzione significativa nell'escrezione di ammonio-N in entrambe le specie ( $p < 0.01$ ).

Anche per l'escrezione di urea-N si osservano tassi di escrezione, in normossia, molto diversi tra le due specie, più bassi in carassio dorato ( $p < 0.05$ ). L'ipossia acuta riduce significativamente l'escrezione di urea-N in entrambe le specie, con un abbassamento più marcato in carassio dorato ( $p < 0.01$ ).

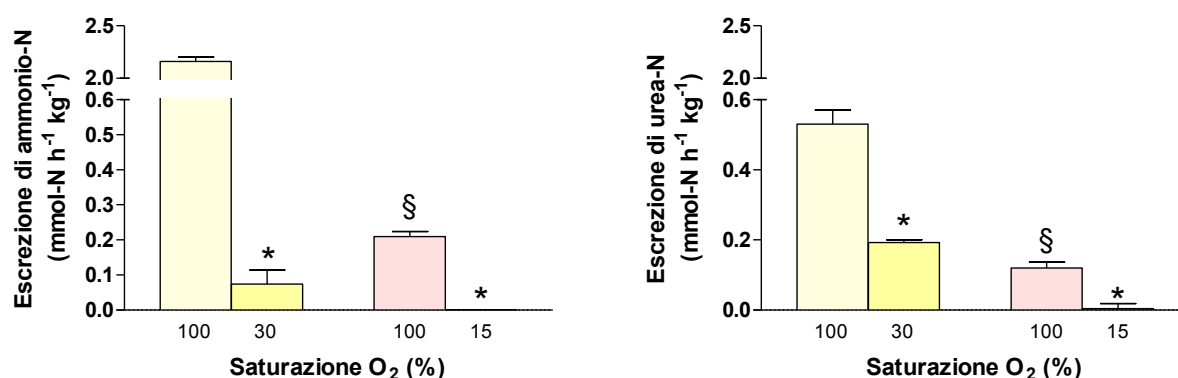


Figura 4.18 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sull'escrezione azotata (ammonio-N ed urea-N) in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

#### **4.12 Effetto dell'ipossia acuta sui livelli ematici di lattato, azoto ureico e nitrito in pesce zebra e carassio dorato**

I livelli di lattato (Fig. 4.19), urea-N (Fig. 4.20) e nitrito-N (Fig. 4.21) sono stati determinati nel sangue di pesce zebra e carassio dorato in seguito a diminuzione acuta (1h e 5h, rispettivamente) dei livelli di ossigeno ambientale (ipossia severa, 30% per pesce zebra e 15% per carassio dorato). Il trattamento ipossico è stato effettuato alla temperatura di acclimatazione delle due specie (27 °C per pesce zebra e 20 °C per il carassio dorato). Le possibili differenze rispetto al controllo (condizione normossica, 100% saturazione di ossigeno) dei parametri misurati sono state valutate mediante l'analisi con ANOVA a due vie, seguita da Bonferroni post hoc test.

In normossia i livelli di lattato nel sangue (mM) sono comparabili nelle due specie (~5mM). In ipossia acuta si osserva una significativa differenza tra le due specie: mentre in pesce zebra il lattato aumenta a valori di ~28mM, in carassio dorato i livelli di lattato restano simili al controllo. I livelli di urea-N nel sangue, in normossia, sono molto più alti in pesce zebra (~ 40 mM-N) che in carassio dorato (< 1 mM-N). L'abbassamento acuto dell'ossigeno ambientale porta in entrambe le specie ad un aumento notevole e significativo ( $P < 0.01$ ) nei livelli ematici di urea-N, che raddoppia in pesce zebra e aumenta di più di 10 volte in carassio dorato.

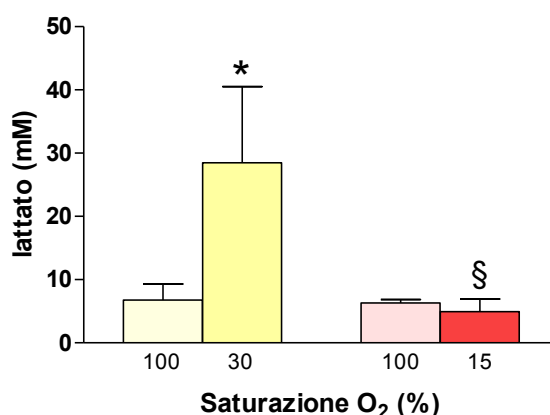


Figura 4.19 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di lattato nel sangue in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media ± SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.



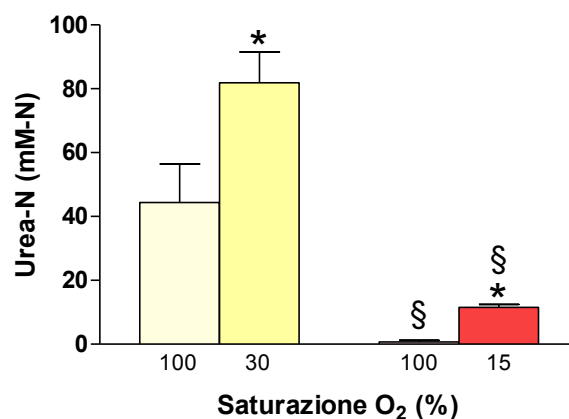


Figura 4.20 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di urea-N nel sangue in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

In normossia, i livelli di nitrito-N nel sangue (mM-N) sono significativamente più alti ( $P < 0.01$ ) in pesce zebra (0.07 mM-N) che in carassio dorato, nel quale i valori non sono significativamente diversi da zero. Il trattamento ipossico porta ad una diminuzione significativa ( $p < 0.05$ ) di nitrito-N nel sangue in pesce zebra. In carassio dorato, invece, l'ipossia porta ad un aumento dei livelli di nitrito-N nel sangue, sebbene non significativo. In ipossia non si osserva differenza significativa dei livelli di nitrito-N tra le due specie.

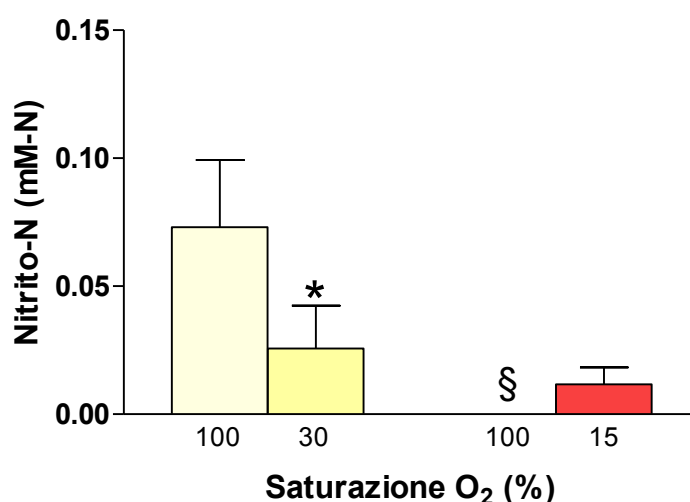


Figura 4.21 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di nitrito-N nel sangue in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

#### 4.13 Effetto dell'ipossia acuta sui livelli muscolari di lattato, ammonio ed azoto ureico in pesce zebra e carassio dorato

In condizioni di 100% di saturazione di O<sub>2</sub> le due specie presentano livelli di lattato muscolare (espressi sia in  $\mu\text{mol g(tessuto)}^{-1}$ , Fig. 4.22-sinistra, che in  $\mu\text{mol mg(Pr)}^{-1}$ , Fig. 4.22-destra) diversi ma non significativi, più alti in pesce zebra che in carassio dorato. In ipossia, si osserva una differenza significativa tra le due specie ( $p < 0.05$ ), con livelli di lattato minori in carassio che in pesce zebra ( $\sim 20 \mu\text{mol g(tessuto)}^{-1}$  e  $\sim 40 \mu\text{mol g(tessuto)}^{-1}$ , rispettivamente). Il quadro non cambia quando i livelli di lattato nel muscolo sono espressi in  $\mu\text{mol mg Pr}^{-1}$ , a parte il fatto che la differenza di specie in ipossia non è più significativa.

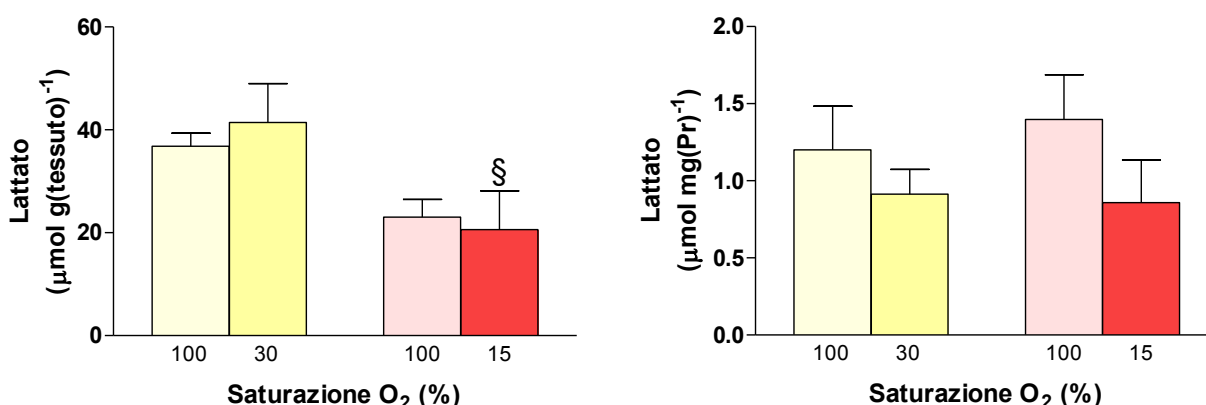


Figura 4.22 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di lattato nel tessuto muscolare di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

In normossia, i livelli di ammonio-N muscolare, espressi sia in  $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$  (Fig. 4.23-sinistra) che in  $\text{nmol-N mg(Pr)}^{-1}$  (Fig.4.23-destra), sono comparabili nelle due specie. Il trattamento ipossico induce una risposta significativamente diversa nelle due specie; in pesce zebra l'ammonio-N aumenta, mentre si riduce a

livelli non significativamente diversi da zero in carassio dorato. La risposta mostra lo stesso andamento, anche se espressa in funzione del contenuto proteico.

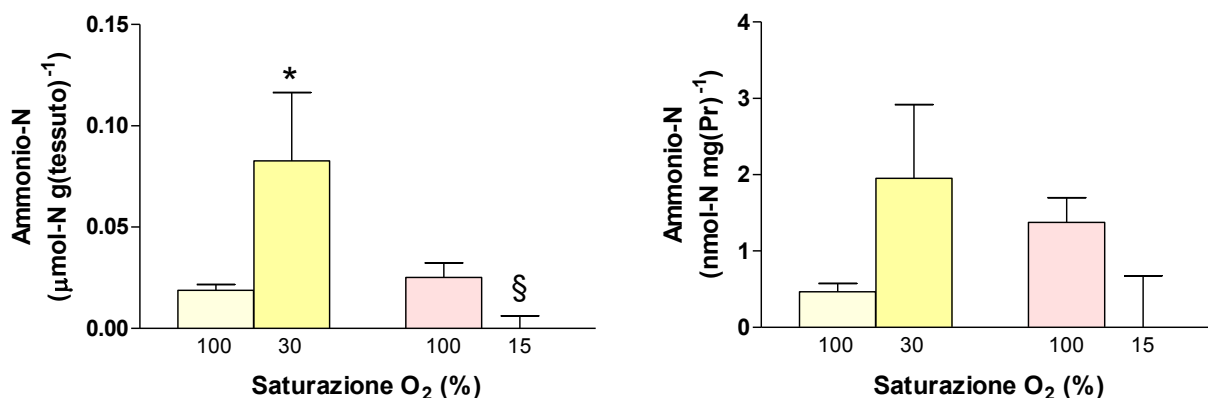


Figura 4.23 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di ammonio-N nel tessuto muscolare di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

Non si osservano differenze significative nei livelli muscolari di urea-N, espressi sia come  $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$  (Fig. 4.24-sinistra) che come  $\text{nmol-N mg(Pr)}^{-1}$  (Fig. 4.24-destra), sebbene si abbia una consistente riduzione dei valori, soprattutto se espressi per mg di proteine, in pesce zebra in seguito all'ipossia.

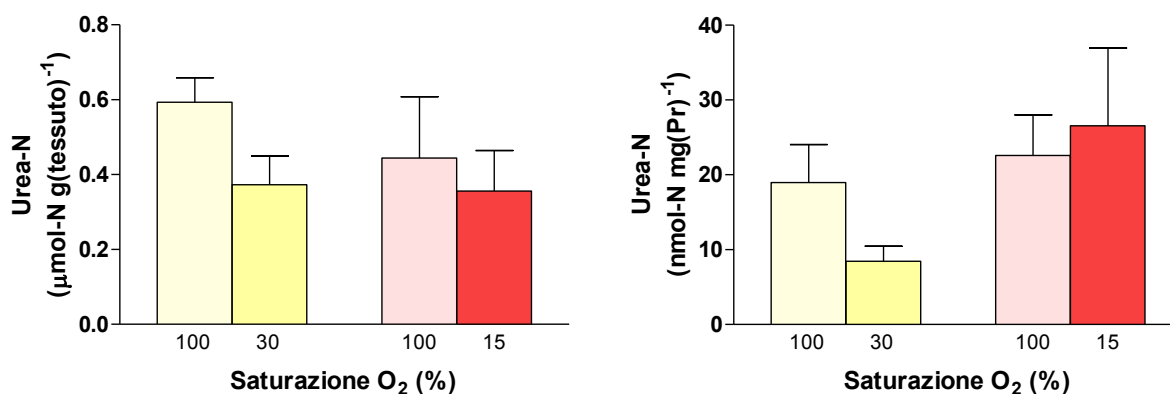


Figura 4.24 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di urea-N nel tessuto muscolare di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

In normossia, il contenuto di nitrito-N (Fig. 4.25) nel muscolo è quasi trascurabile in pesce zebra e significativamente inferiore a quello del carassio dorato ( $\sim 30 \mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$ , pari a  $\sim 1.8 \mu\text{mol-N g(Pr)}^{-1}$ ). L'abbassamento dell'ossigeno ambientale porta ad un forte e significativo aumento del nitrito-N a valori superiori ai  $30 \mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$  in pesce zebra, che non si osserva in carassio dorato.

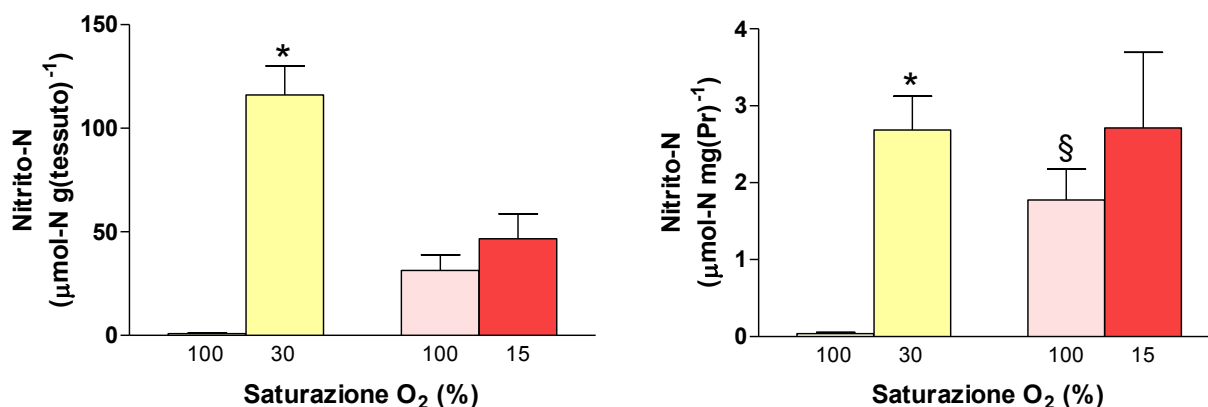


Figura 4.25 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di nitrito-N nel tessuto muscolare di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

#### 4.14 Effetto dell'ipossia acuta sull'attività dell'arginasi in pesce zebra e carassio dorato

In Fig. 4.26 è riportata l'attività specifica dell'arginasi muscolare, espressa come  $\mu\text{mol-urea h}^{-1} \text{g(tessuto)}^{-1}$  e  $\mu\text{mol-urea h}^{-1} \text{mg(Pr)}^{-1}$ . I livelli di questo enzima sono molto diversi in normossia nelle due specie, con un'attività pressoché trascurabile in carassio dorato ( $P < 0.01$ ) rispetto al pesce zebra. L'ipossia acuta porta ad un aumento considerevole dei livelli di attività di arginasi in entrambe le specie ( $p < 0.01$ ). L'aumento risulta più consistente in pesce zebra ( $\sim 300 \mu\text{mol-urea h}^{-1} \text{g(tessuto)}^{-1}$ , un aumento di circa 20 volte) che in carassio dorato ( $\sim 15 \mu\text{mol-urea h}^{-1} \text{g(tessuto)}^{-1}$ , un aumento di circa 10 volte).

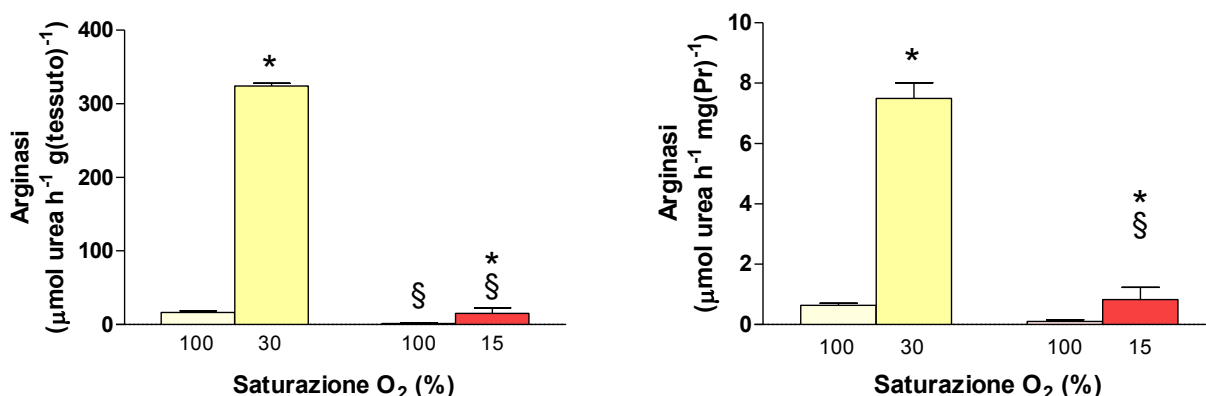


Figura 4.26 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sull'attività arginasi del tessuto muscolare di pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>, nell'ambito di ciascuna specie.

#### **4.15 Effetto del trattamento acuto con nitrito durante esposizione acuta ad ipossia ambientale sull'escrezione azotata in pesce zebra e carassio dorato**

La velocità di escrezione di ammonio-N ed urea-N sono stati determinati durante l'ipossia acuta (30%, 1h per pesce zebra e 15%, 5h per carassio dorato) a cui sono stati sottoposti gruppi di animali preventivamente trattamento con nitrito 10μM e 2mM (Fig. 4.27). Le possibili differenze rispetto al controllo (100% O<sub>2</sub> e assenza di nitrito ambientale) dei parametri misurati sono state valutate mediante l'analisi con ANOVA a due vie, seguita da Bonferroni post hoc test.

In condizioni di ipossia, dovendo mantenere costante il livello di ossigeno ambientale, non è stato possibile misurare il consumo di ossigeno. L'attività degli animali in ipossia si riduce a livelli non significativamente diversi da 0 (pesce zebra) o è assente (carassio dorato).

In pesce zebra, si osserva un aumento significativo, indotto dall'ipossia ( $p < 0.01$ ), sia di  $M_{\text{amm-N}}$  che di  $M_{\text{urea-N}}$  solo nel gruppo pretrattato con nitrito 10μM. Questi due parametri, invece, che comunque rimangono inferiori ai livelli osservati in pesce zebra, tendono ad aumentare soprattutto nei gruppi di carassio dorato pretrattati con nitrito 2 mM, anche se le variazioni non sono significative.

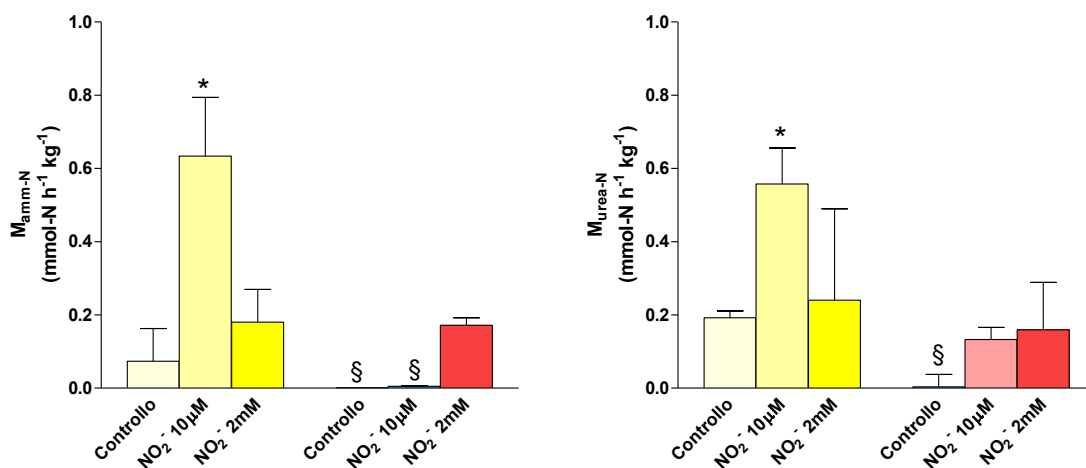


Figura 4.27 - Effetto del trattamento acuto (48h) con nitrito 10µM e 2mM sull'escrezione azotata (ammonio-N, Mamm ed urea-N, Murea) durante l'esposizione acuta ad ipossia ambientale in pesce zebra (■) e carassio dorato (■). I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5-7 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. § differenza significativa tra pesce zebra e carassio dorato; \* differenza significativa rispetto al gruppo di controllo.

#### **4.16 Effetto del trattamento acuto con nitrito durante esposizione acuta ad ipossia ambientale sui livelli ematici di nitrito, urea e lattato in pesce zebra e carassio dorato**

In pesce zebra e carassio dorato sono stati valutati i livelli ematici di nitrito-N, urea-N e lattato, a seguito dell'esposizione ad ipossia acuta (30%, 1h per pesce zebra e 15%, 5h per carassio dorato) in animali preventivamente sottoposti al trattamento acuto (48h) con nitrito ambientale alle concentrazioni di 10µM e 2mM. Le possibili differenze rispetto al controllo (100% O<sub>2</sub> e assenza di nitrito ambientale) dei parametri misurati sono state valutate mediante l'analisi con ANOVA a due vie, seguita da Bonferroni post hoc test.

In pesce zebra, la combinazione dei due stress, nitrito ed ipossia, non porta a variazioni significative nei parametri valutati, oltre a quelli indotti dal nitrito da solo (Fig. 4.28).

In carassio dorato, si osserva, invece, un aumento significativo dei livelli muscolari di urea-N, più evidente nei pre-trattati con nitrito 10µM, nei quali questo aumento è significativamente ( $p < 0.05$ ) maggiore di quello osservato nel gruppo non pre-

trattato con nitrito. Non si osservano effetti significati dell'ipossia combinata con stress da nitrito sui livelli ematici di nitrito e lattato.

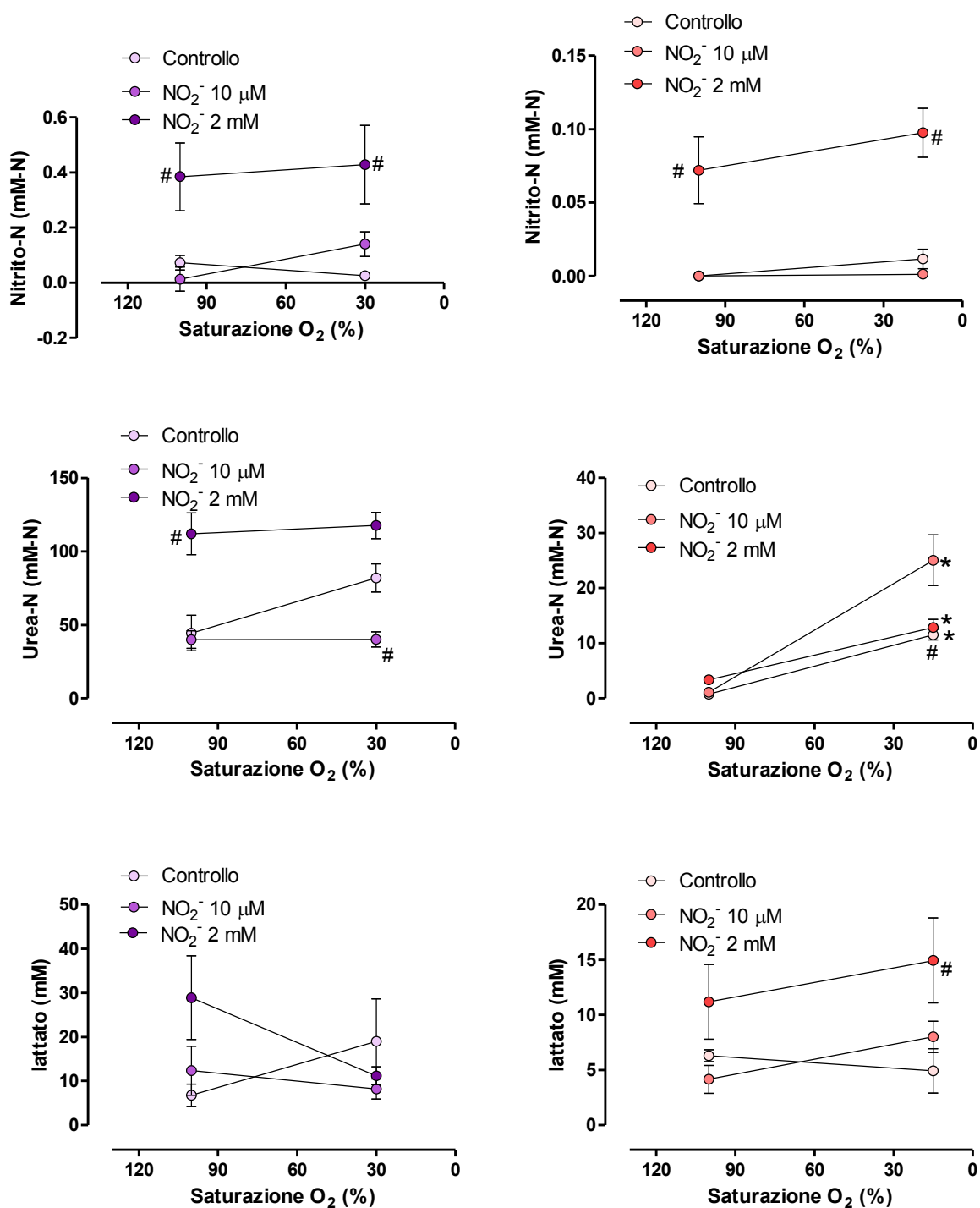


Figura 4.28 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di nitrito, azoto ureico e lattato nel sangue di pesce zebra (■) e carassio dorato (■), in condizioni di controllo e in presenza di nitrito ambientale 10μM e 2mM. I valori sono la media ± SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. # differenza significativa rispetto al valore di controllo a ciascun livello di saturazione di O<sub>2</sub>; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>.

#### **4.17 Effetto della combinazione dell'esposizione acuta ad ipossia severa con il trattamento acuto con nitrito ambientale sui livelli muscolari di nitrito, ammonio, urea, lattato ed enzima arginasi**

In pesce zebra e carassio dorato sono stati valutati i livelli muscolari di nitrito-N ( $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$ ), ammonio-N ( $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$ ), urea-N ( $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$ ) e lattato ( $\mu\text{mol lattato g(tessuto)}^{-1}$ ), a seguito dell'esposizione ad ipossia acuta (30%, 1h per pesce zebra e 15%, 5h per carassio dorato) in animali preventivamente sottoposti al trattamento acuto (48h) con nitrito ambientale alle concentrazioni di 10 $\mu\text{M}$  e 2mM. Le possibili differenze tra le specie e rispetto al controllo (100% O<sub>2</sub> e assenza di nitrito ambientale) dei parametri misurati sono state valutate mediante l'analisi con ANOVA a due vie, seguita da Bonferroni post hoc test.

In pesce zebra, la combinazione dei due stress, nitrito ed ipossia, porta ai seguenti principali effetti (Fig. 4.29):

- 1) aumento dei livelli muscolari di nitrito-N (fino a valori dell'ordine dei 400  $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$ ) solo negli animali pretrattati con nitrito 2 mM;
- 2) diminuzione significativa ( $p < 0.05$ ) dell'ammonio tissutale in entrambi i gruppi pretrattati con nitrito;
- 3) diminuzione significativa dei livelli di urea-N, identica a quella osservata nel gruppo di controllo (cioè non trattato con nitrito);
- 4) nessuna variazione significativa nei livelli di lattato.

In carassio dorato, si osserva invece:

- 1) aumento dei livelli muscolari di nitrito-N in entrambi i gruppi trattati con nitrito; l'aumento relativo è proporzionalmente maggiore nel gruppo tratto con nitrito 10 $\mu\text{M}$ , raggiungendo valori di oltre 200  $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$ , mentre nei trattati 2 mM, si raggiungono livelli prossimi ai 500  $\mu\text{mol-N g(tessuto)}^{-1}$ ;
- 2) si ha un significativo e notevole aumento dell'ammonio-N tissutale solo nei trattati con nitrito 2 mM;



- 3) anche in carassio dorato i livelli di urea-N muscolare diminuiscono significativamente in ipossia; tuttavia, in questo caso, l'effetto dell'ipossia è diverso da quello indotto sui controlli, nei quali ipossia non riduce il contenuto muscolare di urea-N;
- 4) a differenza di quanto osservato in pesce zebra, l'ipossia induce un significativo ( $p < 0.05$ ) aumento dei livelli muscolari di lattato, solo nel gruppo dei pretrattati con nitrito 2 mM.

#### ***4.18 Effetto del trattamento acuto con nitrito durante esposizione acuta ad ipossia ambientale sull'attività dell'arginasi muscolare in pesce zebra e carassio dorato***

In pesce zebra e carassio dorato sono stati valutati i livelli muscolari dell'attività dell'enzima arginasi, a seguito dell'esposizione ad ipossia acuta (30%, 1h per pesce zebra e 15%, 5h per carassio dorato) in animali preventivamente sottoposti al trattamento acuto (48h) con nitrito ambientale alle concentrazioni di 10 $\mu$ M e 2mM. Le possibili differenze tra le specie e rispetto al controllo (100% O<sub>2</sub> e assenza di nitrito ambientale) dei parametri misurati sono state valutate mediante l'analisi con ANOVA a due vie, seguita da Bonferroni post hoc test. I risultati sono riportati in Fig. 4.30.

In pesce zebra, si osserva, nel gruppo pretrattato con nitrito 10 $\mu$ M, un aumento dell'attività arginasica indotta dall'ipossia identico a quello osservato nei controlli; invece, nel gruppo pretrattato con nitrito 2 mM (che di per se induce un forte aumento dell'attività di questo enzima), l'ipossia induce ne riduce significativamente ( $p < 0.05$ ) l'attività.

In carassio dorato, invece, l'ipossia non porta a variazioni significative nell'attività di questo enzima, rispetto a quelle indotte dal nitrito da solo.

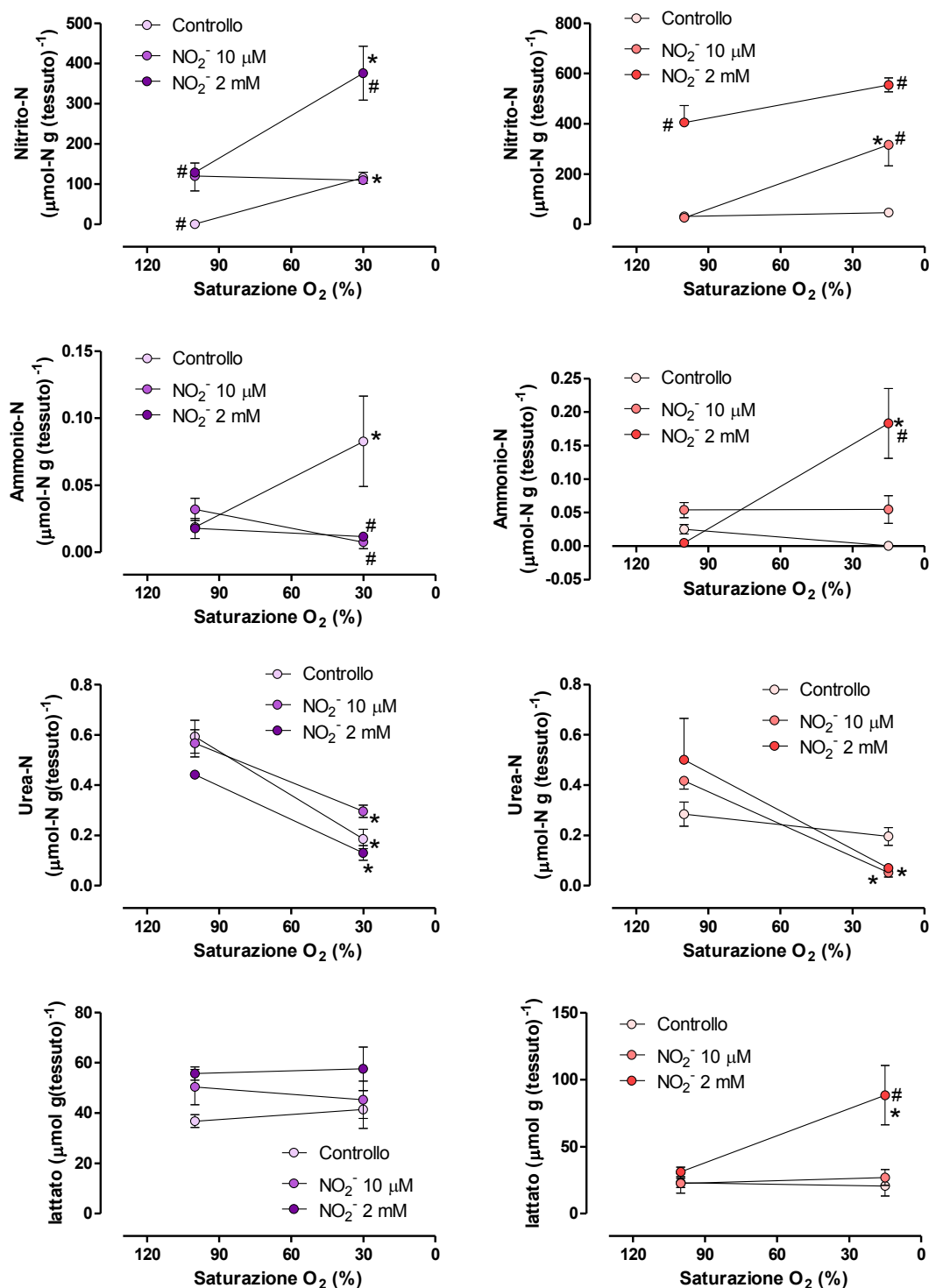


Figura 4.29 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sui livelli di nitrito, ammonio-N, urea-N e lattato nel tessuto muscolare di pesce zebra (■) e carassio dorato (■), in condizioni di controllo e in presenza di nitrito ambientale 10 $\mu\text{M}$  e 2mM. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. # differenza significativa rispetto al valore di controllo a ciascun livello di saturazione di O<sub>2</sub>; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>.

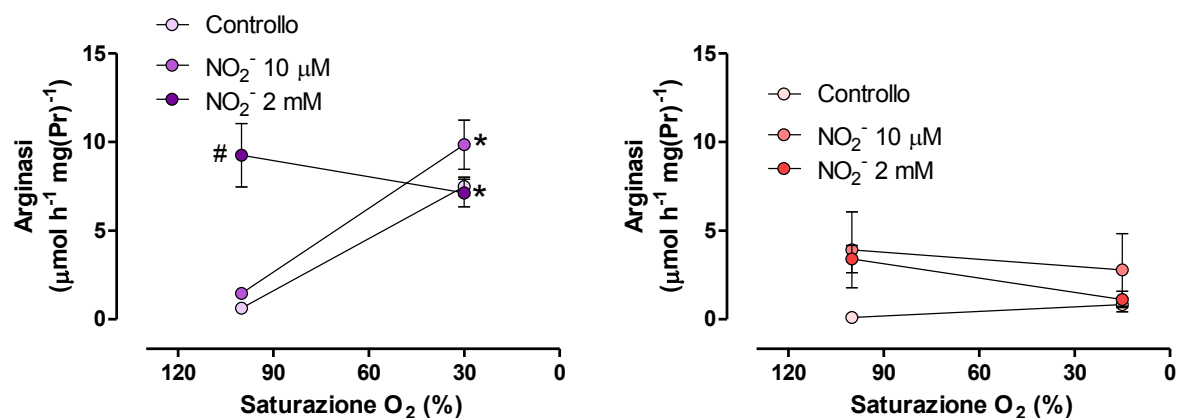


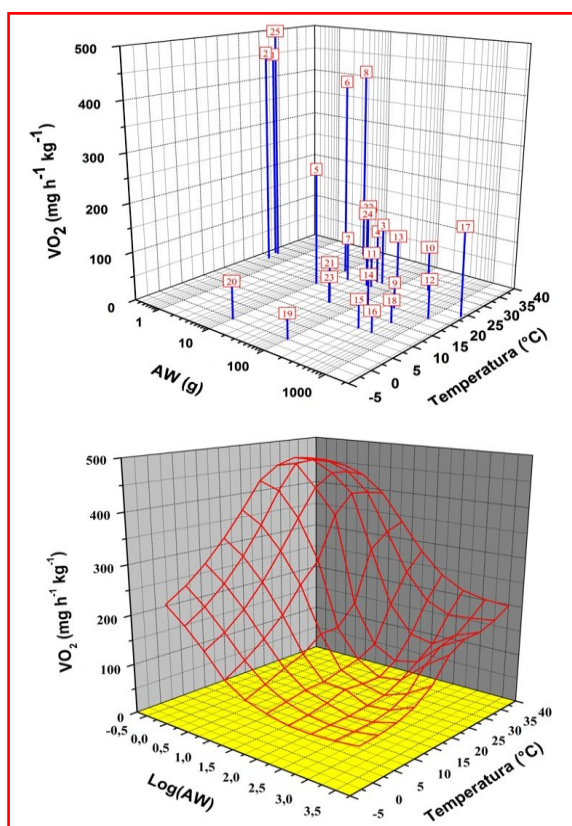
Figura 4.30 - Effetto di una diminuzione acuta dell'ossigeno ambientale sull'attività arginasica nel tessuto muscolare di pesce zebra (■) e carassio dorato (■), in condizioni di controllo e in presenza di nitrito ambientale 10μM e 2mM. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 5 determinazioni. Il confronto statistico fra le medie è stato effettuato mediante ANOVA a due vie, seguita dal Bonferroni post-hoc test. # differenza significativa rispetto al valore di controllo a ciascun livello di saturazione di O<sub>2</sub>; \* differenza significativa rispetto 100% di saturazione di O<sub>2</sub>.

## 5. Discussione

### 5.1 Metabolismo di routine ed escrezione azotata in pesce zebra

Nel considerare le misure metaboliche sui pesci è importante tener conto del fatto che in questi animali il metabolismo basale, inteso come il tasso minimo di consumo di energia necessario a mantenere un organismo in vita (Brett e Groves, 1979), dipende dall'attività spontanea. Da qui deriva il concetto di metabolismo di routine, definito come la velocità metabolica a riposo e a digiuno misurata in un pesce che manifesta una attività spontanea basale (Fry, 1947; Fry, 1957). Ciò implica che le misure metaboliche in questi animali devono essere sempre accompagnate dalla misura dell'attività spontanea. I valori del metabolismo di routine in pesce zebra acclimatati a 27°C sono comparabili a quelli riportati da altri autori (Mitz e Newman, 1989; Akin and Neill, 2003; Lucas e Priede, 1992) (Fig. 5.1). Essi sono, inoltre, in accordo con la relazione inversa tra metabolismo e massa corporea e con la relazione diretta tra metabolismo e temperatura, tipiche dei vertebrati eterotermi (Gillooly et al., 2001; White et al., 2006); in particolare, a causa delle piccole dimensioni e dell'alta temperatura di acclimatazione, sono valori piuttosto alti se comparati a quelli di altre specie (Fig. 5.1). L'attività di routine

(17.53 virate min<sup>-1</sup>) rientra nel range di valori riportati da Lucas e Priede (1992) (5–60 virate min<sup>-1</sup>) e simile a quella riportata da Plaut e Gordon (1994) per individui posti in un tunnel del nuoto alla minima velocità (1 BL s<sup>-1</sup>), vale a dire ben al di sotto di quella alla quale pesce zebra comincia a nuotare regolarmente controcorrente (8 BL s<sup>-1</sup>).



Siniperca chuatsi; 22) Siniperca chuatsi; 23) Channa argus; 24) Channa argus; 25) Gambusia affinis (Fernandes, 1989; Lucas e Priede, 1992; Montgomery e Wells, 1993; Plaut, and Gordon, 1994; Claireaux et al., 2000, Liu et al., 2000; Person – Le Ruyet, 2004; Agnisola e Femiano, 2006).

Il metabolismo dell'azoto nei pesci fornisce ampie informazioni sul loro stato funzionale e sugli adattamenti che gli stessi possono mettere in atto in risposta a fattori stressogeni (Rychly e Marina, 1977; Jobling, 1981; Perera et al., 1995; Frick e Wright, 2002; Fournier et al., 2003). Dai dati in Tabella 4.1 si ricava che l'escrezione ureica basale rappresenta il 40% dell'escrezione azotata totale in pesce zebra, un valore relativamente alto se comparato con quello della maggior parte dei teleostei (v. Tab. 2.1). Braun et al. (2009b) hanno riportato in pesce zebra adulti, valori simili di escrezione di ammonio-N ma valori inferiori di escrezione di urea-N.

Nel presente studio sono riportati per la prima volta sia i livelli ematici che muscolari di ammonio e urea in pesce zebra adulti in condizioni basali e in condizioni di stress.

Nei teleostei d'acqua dolce i livelli di ammonio ematico sono più alti che nei mammiferi, dove livelli superiori a 0.5 mM sono tossici per il sistema nervoso. L'ammonio nel sangue dei teleostei varia tra 0.05 e 1 mM (Wright et al. 1993) ed in condizioni di stress può raggiungere valori tossici (2 mM) (Lumsden et al. 1993). I dati riportati in Tab. 4.2 rientrano nei valori tipici dei teleostei.

Nel sangue dei pesci, l'urea varia molto sia tra gli elasmobranchi, in cui sono noti livelli tra 300-600mM, nei quali l'urea ha il ruolo di osmolita, che nei teleostei d'acqua dolce, dove in genere si mantiene tra i 2 e i 4 mM (Mathai, 2005). In pesce zebra i livelli ematici di urea-N risultano essere di un ordine di grandezza superiore ai livelli tipici dei teleostei d'acqua dolce.

Braun et al. (2009b) riportano valori di circa  $2.0 \mu\text{mol g}^{-1}$  di peso corporeo per l'ammonio-N e di meno di  $2.0 \mu\text{mol g}^{-1}$  di peso corporeo per l'urea-N in pesce zebra adulto; anche tenendo conto del fatto che i valori riportati in Tab. 4.3 sono riferiti al g di tessuto muscolare, nell'adulto, il contenuto di urea-N negli animali utilizzati per il presente studio appare simile, mentre quello di ammonio è decisamente inferiore. Inoltre, la concentrazione di urea-N eccede quella di ammonio-N, sia nel tessuto muscolare che nel sangue.

Il metabolismo di routine fornisce informazioni circa i processi metabolici aerobici coinvolti nella risposta funzionale dell'animale. La componente metabolica anerobica coinvolta può essere investigata dall'analisi dei livelli di lattato. Plaut e Gordon (1994) riportano livelli di lattato in pesce zebra di  $\sim 4 \mu\text{mol g}^{-1}$  (valori "whole body"). Mc Celland et al. (2006) riportano livelli di lattato muscolare di pesce zebra acclimatati a  $28^{\circ}\text{C}$  di  $0.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Questi valori inferiori a quanto riportato nel presente studio; infatti, dai dati riportati in Tab. 4.3 e assumendo che il tessuto muscolare rappresenti circa il 50% della massa corporea in questa specie, si ottiene un contenuto medio di circa  $20 \mu\text{mol g}^{-1}$  di peso corporeo.

Il livello fisiologico di nitrito nel sangue di teleostei d'acqua dolce è generalmente  $<10 \mu\text{M}$  (Jensen, 2009). I valori osservati nel presente studio sono di poco superiori a questo livello e riflettono il suo possibile ruolo fisiologico (Hansen e Jensen, 2010; Jensen e Hansen 2011).

In definitiva, la maggior parte dei parametri misurati in condizioni di controllo in pesce zebra sono in accordo con i pochi dati presenti in letteratura, con alcune differenze probabilmente legate a diverse condizioni di mantenimento o variabilità tra le diverse popolazioni di pesce zebra utilizzate.

Per la prima volta sono anche riportati, in pesce zebra, i livelli di attività dell'arginasi e dei principali enzimi coinvolti nel ciclo dell'urea, CPSasi III, OCTasi, ASS. La bassa attività della CPSasi III, l'enzima necessario ad alimentare il ciclo dell'urea, suggerisce che, almeno in condizioni basali, il contributo dell'OU-C alla produzione di urea in questa specie è limitato. L'attività arginasica è quella più elevata e simile a quella riportata in embrioni di pesce zebra (Fuentealba Gonzalez et al., 2011). Il tessuto muscolare si conferma una fonte importante di urea nei teleostei, probabilmente per arginolisi (Braun et al., 2009a; Kong et al., 1998). La presenza di un'escrezione ureica relativamente alta ben si correla con l'attività dell'arginasi, pur rimanendo l'escrezione di ammonio-N superiore a quella ureica, come nella maggior parte dei teleostei. I livelli particolarmente elevati di ASS possono essere legati al fatto che questo enzima non è coinvolto solo nel ciclo dell'urea ma anche nel ciclo citrullina-NO (v. Fig. 2.10), e può essere importante nell'omeostasi dell'ossido nitrico (Husson et al., 2003).

## **5.2 Stress da salinità e temperatura**

Nella prima parte del presente studio è stata valutata la risposta del metabolismo di routine e dell'escrezione azotata a variazioni di salinità e temperatura ambientale, comparando gli effetti osservati con quelli indotti in una specie, la gambusia, caratterizzata da una elevata tolleranza a questi due tipi di stress (Nordlie, 1987; Haney e Nordlie, 1997). In Fig. 5.2 sono schematizzati i principali effetti osservati.

Il pesce zebra mostra una ridotta tolleranza all'aumento di salinità ambientale rispetto alla gambusia, come dimostrato dal fatto che in prove preliminari il trattamento acuto con salinità superiori al 25‰ porta al 100% di mortalità. In questa specie si osservano scarse variazioni nel metabolismo di routine sia in seguito a stress da salinità che da temperatura, a parte la tendenza ad un aumento di attività spontanea. Questo aumento è particolarmente elevato in condizioni di stress combinato, associato ad una forte riduzione del metabolismo. Scarsi sono anche gli effetti sia dello stress da salinità che da temperatura sul metabolismo di routine in gambusia. Anche in gambusia lo stress combinato porta ad una riduzione del metabolismo di routine, sebbene se di

lieve, ma significativa entità. La riduzione di metabolismo ad elevate salinità è considerata una risposta metabolica tipica dei teleostei (Haney e Nordlie, 1997), con conseguenze fisiologiche più o meno gravi che possono implicare danni ai processi di osmoregolazione, ridotta capacità di nuoto e problemi di crescita (Plaut, 2000). Tuttavia, nelle condizioni del presente studio, solo la combinazione dell'elevata salinità e dello stress termico ha portato alla riduzione di questo parametro.

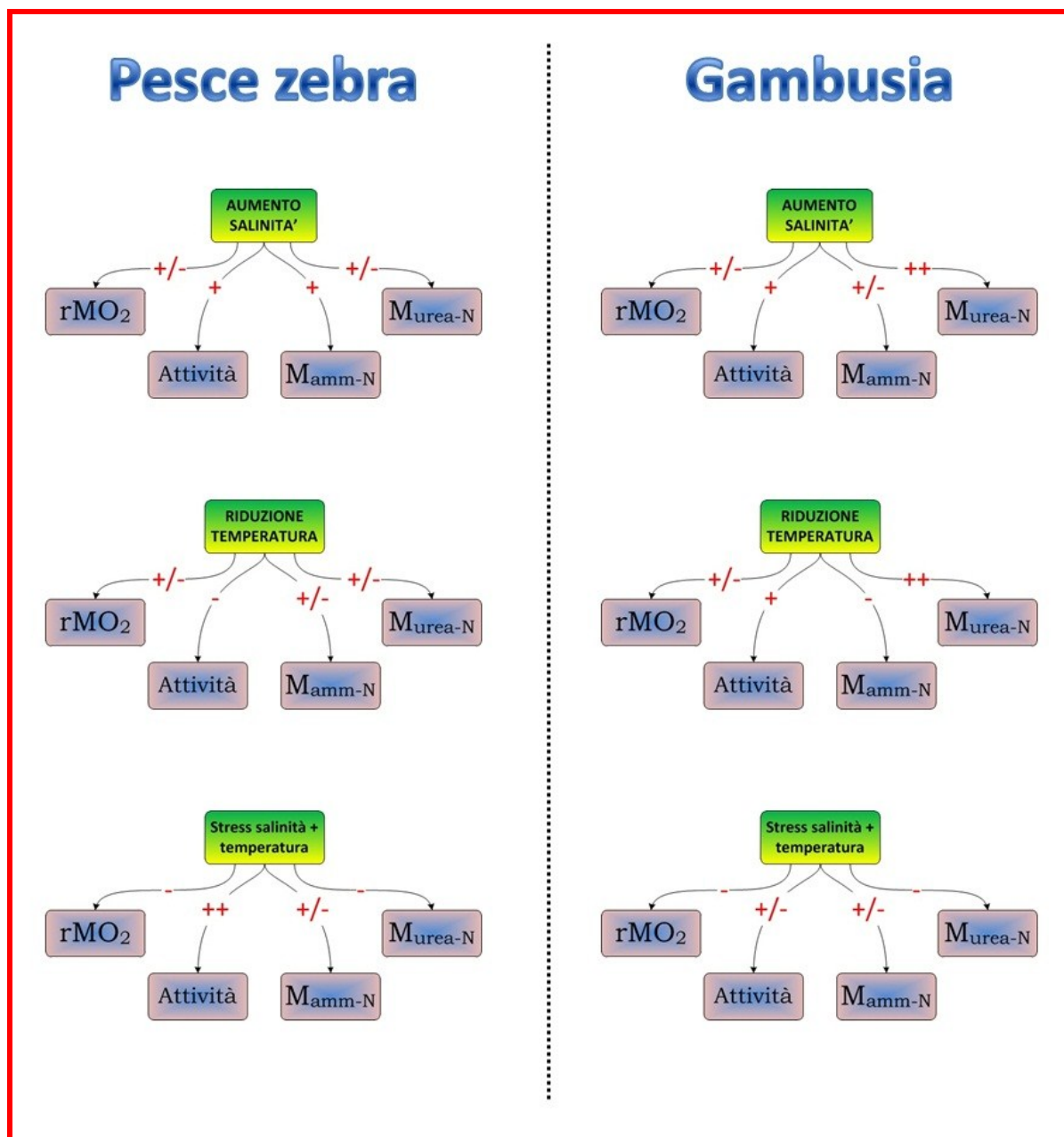


Figura 5.2 - Rappresentazione schematica dei principali effetti metabolici osservati in pesce zebra e gambusia in seguito a stress da aumento di salinità ambientale, riduzione di temperatura, o una combinazione di entrambi. ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

E' da notare che gli effetti della sola riduzione della temperatura su rMO<sub>2</sub> non sembrano riflettere la nota e prevista relazione diretta fra temperatura e velocità metabolica tipica degli

eterotermi. E' probabile che ciò sia dovuto sia all'elevata variabilità interindividuale di questo parametro nelle due specie considerate, evidenziato dagli elevati valori degli SD ( $=SEM \times N^{-2}$ ), sia agli effetti dello stress sull'attività spontanea. Ad es., in gambusia l'aumento significativo dell'attività di routine, che può indicare una spinta degli animali alla fuga dalla condizione di stress (risposta da evitamento, osservata in natura per questa specie, Winkler, 1979; Alcaraz e Garcia-Berthou, 2007), può senz'altro contribuire all'apparente aumento dell' $rMO_2$  medio quando la temperatura è ridotta da 27 a 20°C.

Queste considerazioni suggeriscono che il metabolismo di routine di questi organismi non possa essere considerato come un parametro di performance particolarmente sensibile allo stress ambientale. Sebbene possa essere stimolante l'idea che il cambiamento di osmolarità ambientale alteri i costi energetici per l'osmoregolazione, nel complesso i dati di  $rMO_2$  non sembrano indicare significativi cambiamenti correlabili con ipotetici cambiamenti nei costi osmoregolativi. Ciò suggerisce due possibilità: i. sia pesce zebra che gambusia hanno scarsa capacità osmoregolativa, soprattutto in ambiente ipertonico; oppure, ii. le variazioni nel costo energetico per osmoregolazione sono nascoste da fenomeni diversi associati alla risposta da stress indotta dall'aumento di salinità (aumento di ormoni da stress e effetti metabolici correlati).

Anche l'escrezione di ammonio-N presenta scarse variazioni al variare di salinità e temperatura nelle due specie. Un aumento si osserva in pesce zebra alla sola salinità 10‰.

La principale differenza osservata tra le due specie sta nell' $M_{urea-N}$ . Mentre in pesce zebra questo parametro non varia significativamente, in gambusia, nella quale in condizioni di controllo l'escrezione di urea-N rappresenta meno del 20% dell'escrezione azotata totale, si ha un forte aumento di questo parametro sia con l'aumento di salinità che con la diminuzione di temperatura. Con l'esposizione al 35‰,  $M_{urea-N}$  diventa oltre l'80% dell'escrezione azotata totale. L'aumento del contributo dell'urea all'escrezione azotata totale indotto dallo stress termico è dello stesso ordine di grandezza. Sembra, quindi, che in queste condizioni, la gambusia diventi ureotelica, e che, pertanto, si possa includere questa specie tra quelle ureoteliche facoltative. La lista di teleostei nei quali l'urea è o può diventare in condizioni di stress ambientale il maggiore dei componenti dell'escrezione azotata si sta allargando negli ultimi anni (Barimo et al., 2007; Mathai, 2005; Terjensen, 2008). L'aumento della salinità ambientale potrebbe indurre in gambusia un aumento dei livelli di urea attraverso l'attivazione del ciclo ornitina-urea (OU-C), come osservato in un altro teleosteo d'acqua dolce (*Himantura signifer*) esposto a concentrazioni crescenti di sali (Tam et al., 2003). In anguilla, è stato dimostrato che l'attività del trasportatore branchiale di urea, localizzato a livello delle cellule del cloro, è dipendente dalla salinità ambientale (Mistry et al., 2001).



E' da notare, infine, che la riduzione del metabolismo di routine in condizioni di stress combinato (salinità + temperatura) è associato ad una significativa riduzione di  $M_{urea-N}$  in pesce zebra e all'annullamento della stimolazione indotta dai due stress separati sull' $M_{urea-N}$  in gambusia, mentre, in entrambe le specie non si hanno effetti significativi su  $M_{amm-N}$ .

In ogni caso, si può concludere che entrambi i tipi di stress ambientale, individualmente o in combinazione inducono un' alterazione dell'escrezione azotata, con effetti diversi su  $M_{amm-N}$  e  $M_{urea-N}$  a seconda del tipo, dell'intensità e della combinazione degli stress, nonché della specie. In particolare, sembra che la maggiore tolleranza a variazioni di salinità e temperatura in gambusia rispetto a pesce zebra (che tuttavia presenta un'elevata  $M_{urea-N}$  già in condizioni basali) si associ ad un aumento consistente dell'escrezione ureica. Pertanto si può supporre che, in entrambe le specie, e soprattutto in gambusia, l'aumento acuto di salinità ambientale e l'abbassamento acuto di temperatura alterino il catabolismo proteico a fronte di un consumo di ossigeno totale invariato o addirittura ridotto. Anche questo risultato potrebbe essere una conseguenza di una risposta da stress e sottolinea l'esigenza di valutare in queste condizioni eventuali cambiamenti degli ormoni da stress, catecolammine e cortisolo. Un altro aspetto da prendere in considerazione è il ruolo giocato dagli amminoacidi nel controllo della concentrazione osmotica intracellulare e del volume cellulare. E' noto che negli invertebrati gli amminoacidi contribuiscono alla pressione osmotica intracellulare per più del 50% (Schoffeniels, 1976). Anche nei teleostei, ed es. in tilapia, gli osmoliti intracellulari, quali, glicina, piccoli carboidrati come inositolo, e metilammine, ossido di trimetilammina (TMAO), urea, possono essere importanti componenti nei processi di osmoregolazione (Fiess et al., 2007). Gli osmoliti organici non alterano le macromolecole, e sono per questo chiamati "soluti compatibili"; in alcuni casi essi proteggono le macromolecole da perturbazioni come temperatura, pressione etc. (Yancey, 2005). E' possibile che alterazioni nell'escrezione azotata in condizioni di stress osmotico possano correlarsi con i processi di controllo della sintesi e della degradazione di amminoacidi osmoliti.

### ***5.3 Stress da nitrito ed ipossia: ipossia funzionale vs ipossia ambientale***

Nella seconda parte del presente studio è stato valutato l'effetto dello stress da ipossia severa, confrontando le conseguenze dell'ipossia funzionale indotta da elevati livelli di nitrito ambientale, con quelle di una diminuzione dell'ossigeno ambientale, e comparando le risposte ottenute in pesce zebra con quelle del carassio dorato, una specie particolarmente nota per la sua elevata tolleranza all'ipossia.

Poiché è noto che il nitrito esplica un ruolo funzionale centrale nell'omeostasi dell'NO in condizioni di ipossia, si è valutato anche l'effetto di concentrazioni ambientali di nitrito considerate trascurabili dal punto di vista tossicologico (10  $\mu$ M), ma tali da alterare le concentrazioni endogene di  $\text{NO}_2^-$  nel range di valori fisiologici.

### **5.3.1 Nitrito ambientale ed emoglobina**

L'esposizione per 48h a nitrito ambientale porta all'assorbimento ed accumulo di questo ione principalmente attraverso le branchie (Kroupova, 2005). Sia i dati ematici che quelli muscolari confermano in entrambe le specie un accumulo di nitrito che si verifica soprattutto alla concentrazione 2mM, e raggiunge livelli più alti in pesce zebra che in carassio, mentre l'accumulo nel muscolo è maggiore per il pesce rosso che per il pesce zebra, a conferma del fatto che nei teleostei l'assorbimento e l'accumulo di nitrito varia tra specie e specie, dal tipo di tessuto, dal tipo e tempo di trattamento, dai tassi di assorbimento branchiale ed è funzione delle caratteristiche funzionali della specie stessa (Aggergaard, 2001; Jensen 2003 Huang, 2002 Bath e Eddy, 1980; Eddy et al., 1983; Margiocco et al., 1983).

Come atteso, elevati livelli di nitrito ambientale (2 mM) hanno portato ad un aumento consistente della metaHb in entrambe le specie, con conseguente riduzione del 50% circa dell'emoglobina funzionale. Pertanto si può affermare che il trattamento con questa concentrazione di nitrito ha indotto in entrambe le specie uno stato di ipossia funzionale (Jensen, 2007).

Si osserva anche un aumento significativo dell'emoglobina nitrosilata. E' interessante notare che 10  $\mu$ M di nitrito ambientale, che, come atteso, non ha effetti evidenti sulla quantità percentuale di metHb, porta ad un aumento della percentuale di nitrosilHb a livelli comparabili a quelli ottenuti con nitrito 2 mM. Tali elevati livelli indotti da concentrazioni ambientali simili a quelli endogeni ed associati ad un accumulo ematico e/o muscolare di nitrito, suggeriscono un'alterazione dell'omeostasi  $\text{NO}_2^-$ -NO-Hb, con possibili conseguenze funzionali. I livelli di nitrosilHb in presenza di nitrito 2 mM sono simili a quelli riportati da Jensen e coll. sia in pesce zebra (Jensen, 2007) che in carassio dorato (Jensen e Hansen, 2011).

### **5.3.2 Effetti del nitrito ambientale su metabolismo ed escrezione azotata**

Come schematizzato in Fig. 5.3, il trattamento con nitrito ambientale 10  $\mu$ M aumenta il metabolismo di routine in pesce zebra, con un forte incremento di  $M_{\text{urea-N}}$  senza variazioni di  $M_{\text{amm-N}}$ . Nonostante le difficoltà incontrate nella valutazione dell'escrezione di ammonio-N, si

può concludere che l'escrezione ureica rappresenti in queste condizioni più del 60% dell'escrezione azotata totale. Il nitrito 10  $\mu$ M non ha effetti sul carassio dorato.

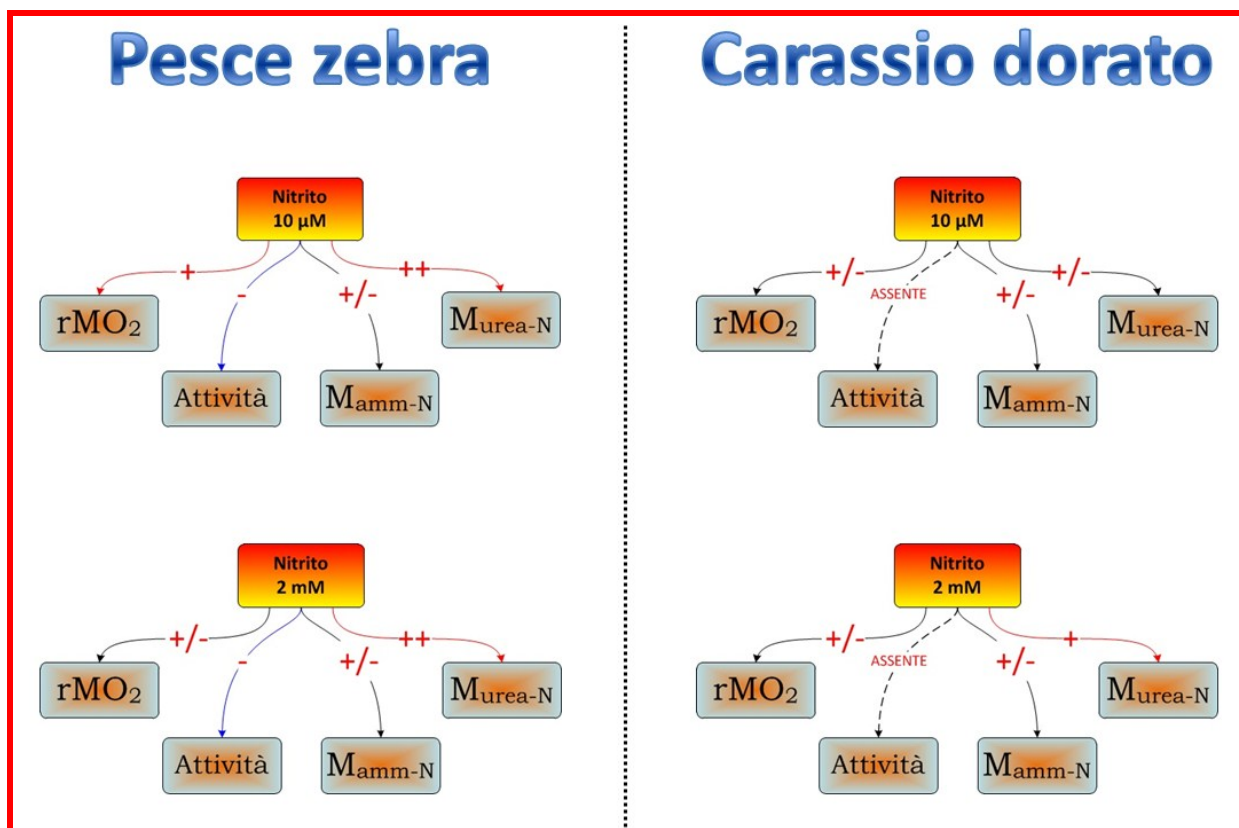


Figura 5.3 - Rappresentazione schematica dei principali effetti metabolici rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da nitrito ambientale. ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

Nitrito 2 mM, d'altra parte, stimola fortemente l'escrezione di urea-N, senza effetti significativi su metabolismo e  $M_{amm-N}$ , in entrambe le specie. E' importante notare che l'aumento di  $M_{urea-N}$  è molto maggiore in pesce zebra (l'escrezione ureica in queste condizioni diventa il 91% dell'escrezione azotata totale) che in carassio dorato (dove l'escrezione ureica rimane ben al di sotto di quella ammoniacale, rappresentando solo il 13% del totale). Pertanto, anche pesce zebra può spostarsi verso l'ureotelismo in condizioni di stress, in questo caso da nitrito ambientale.

Un'osservazione interessante è la diminuzione del contenuto proteico muscolare in carassio dorato indotta dal trattamento con nitrito 2mM. Questo effetto, assente in pesce zebra, è stato già osservato da Ajani et al. (2011) in *Clarias gariepinus* e genericamente associato alla condizione di stress, sebbene meccanismo e significato funzionale siano ancora da stabilire.

La stimolazione dell'escrezione ureica in pesce zebra già a 10  $\mu$ M di nitrito è associata ad aumento dell'attività arginasi muscolare (Fig. 5.4). Contemporaneamente si ha un forte aumento dei livelli di nitrito muscolare, suggerendo una elevata capacità di accumulo di nitrito in queste condizioni, ovvero un'aumentata produzione endogena, possibilmente secondaria alle

alterazioni dell'omeostasi dell'NO, la principale fonte endogena di nitrito (Jensen, 2009). L'attività arginasica aumenta anche in carassio dorato, a livelli inferiori che in pesce zebra, in associazione con un aumento dei livelli di ammonio muscolare.

L'entità delle risposte osservate in pesce zebra al trattamento acuto con nitrito 10  $\mu\text{M}$  appare sorprendente. E' la prima volta che sono effettuati studi degli effetti acuti di nitrito ambientale a livelli micromolari. Tuttavia, Kroupova et al. (2008) hanno mostrato che l'esposizione cronica (28 giorni) di trote arcobaleno a 0.01  $\text{mg l}^{-1}$  (0.17  $\mu\text{M}$ ) di nitrito induce iperplasia dell'epitelio delle lamelle secondarie branchiali e aumento dei livelli ematici di glucosio e potassio.

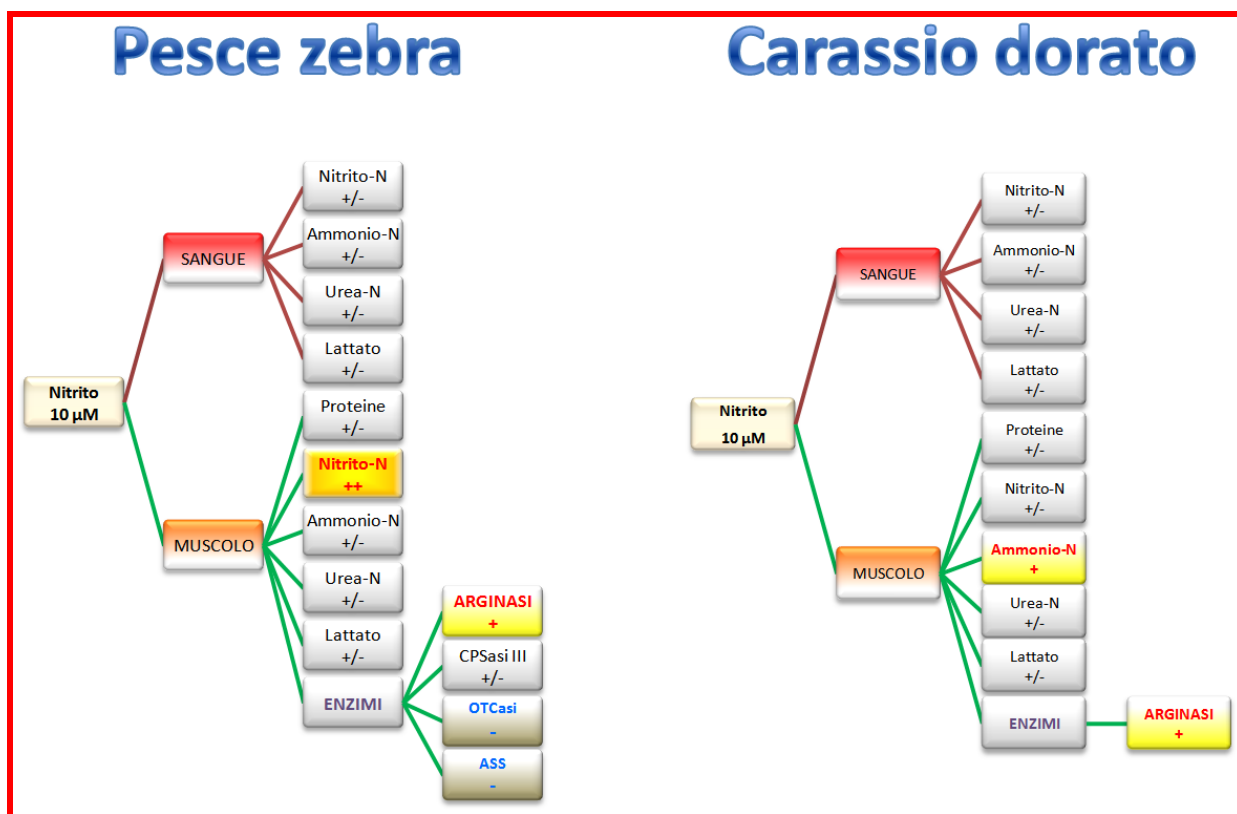


Figura 5.4 - Rappresentazione schematica dei principali effetti sui livelli ematici e muscolari di nitrito-N, ammonio-N, urea-N e lattato, delle proteine muscolari, dell'arginasi muscolare, e, limitatamente al pesce zebra, anche di alcuni enzimi del ciclo dell'urea, rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da nitrito ambientale 10  $\mu\text{M}$ . ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

Gli effetti indotti da nitrito 2 mM (Fig. 5.5) sono più ampi e includono in entrambe le specie una aumentata produzione di lattato muscolare, probabilmente legata all'incremento di metHb e all'ipossia funzionale, che, nel pesce zebra, porta anche ad un innalzamento dei livelli ematici del lattato. Il fatto che in carassio dorato la produzione di lattato sia apparentemente inferiore rispetto al pesce zebra è da collegarsi quasi certamente al fatto che in questa specie il lattato è per lo più convertito in etanolo (Van den Thillart et al., 1983).

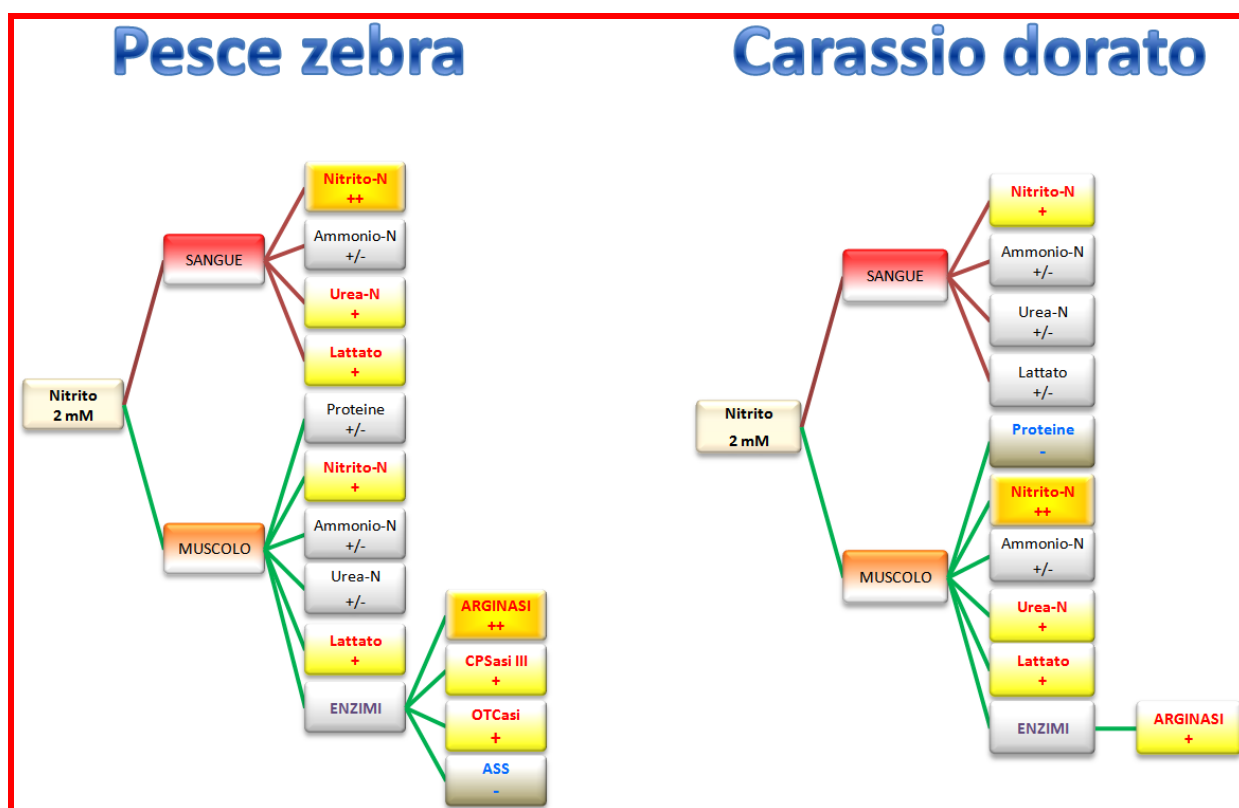


Figura 5.5 - Rappresentazione schematica dei principali effetti sui livelli ematici e muscolari di nitrito-N, ammonio-N, urea-N e lattato, delle proteine muscolari, dell'arginasi muscolare, e, limitatamente al pesce zebra, anche di alcuni enzimi del ciclo dell'urea, rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da nitrito ambientale 2 mM. ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

Come già detto in precedenza, in entrambe le specie si ha, come atteso, un accumulo sia ematico che muscolare di nitrito in seguito al trattamento con nitrito 2mM. Le due specie differiscono nel senso che mentre in pesce zebra il nitrito è aumentato soprattutto nel sangue, in carassio dorato, si accumula soprattutto nel muscolo. Da notare che le concentrazioni ematiche sono molto inferiori a quelle ambientali. E' noto che il nitrito ambientale assorbito attraverso le branchie può accumularsi in vari tessuti, e principalmente muscolo, fegato, branchie e cervello (Park, 2007). Gisbert et al. (2004) hanno riportato nello storione siberiano un accumulo preferenziale nel muscolo scheletrico e nel sangue.

Anche a 2 mM il risultato più importante è il potente effetto stimolatore sull'attività arginasica muscolare, maggiore in pesce zebra. Questo risultato concorda sia con l'aumentata escrezione di urea, già osservata alla dose più bassa, sia con l'accumulo di urea-N nel muscolo e, nel pesce zebra, anche nel sangue.

In pesce zebra è stato possibile anche valutare gli effetti del nitrito ambientale sugli enzimi dell'OUC nel muscolo (Fig. 5.5). L'aumento della CPSasi III nei trattati con nitrito 2mM (i cui livelli restano comunque relativamente bassi) suggerisce che accanto all'arginolisi, ci possa essere l'attivazione del ciclo dell'urea. Infatti, anche se l'ASS si riduce rispetto ai controlli, la

sua attività rimane paragonabile a quella degli altri enzimi coinvolti nell'OU-C, e ciò, insieme all'elevata massa del tessuto muscolare, potrebbe contribuire significativamente all'incremento sia dei livelli corporei che dell'escrezione di urea. E' la prima volta che si hanno indicazioni di una possibile stimolazione del ciclo dell'urea in un teleosteo in seguito a stress ambientale da nitrito.

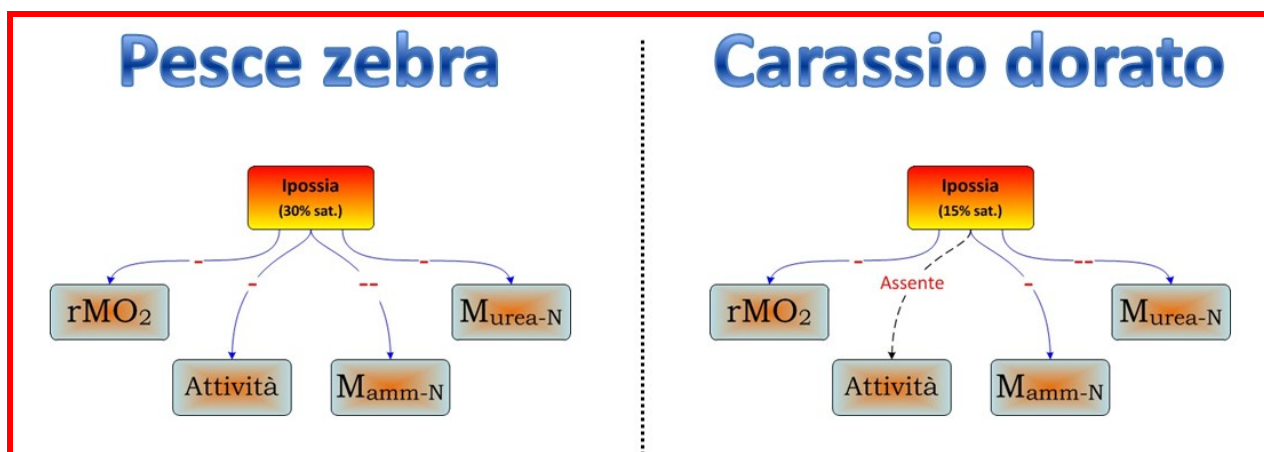


Figura 5.6 - Rappresentazione schematica dei principali effetti metabolici rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da ipossia ambientale severa. Sebbene non sia stato possibile misurare il consumo di ossigeno in queste condizioni, si assume, in base ad osservazioni precedenti e dati della letteratura (Agnisola e Femiano, 2006; Nilson, 2000), che in entrambe le specie si abbia una significativa riduzione di  $rMO_2$  indotta dall'ipossia severa. ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

### 5.3.3 Effetti dell'ipossia acuta severa e della sua combinazione con lo stress da nitrito su metabolismo ed escrezione azotata

Come mostrato in Fig. 5.6, l'ipossia severa riduce l'escrezione azotata in entrambe le specie. L'escrezione ureica in queste condizioni, diventa il 72% dell'escrezione azotata totale in pesce zebra, e l'82% in carassio dorato. Quindi, entrambe le specie si comportano in condizioni di ipossia severa da ureotelici.

Lo schema di Fig. 5.7 evidenzia il fatto che l'ipossia severa in pesce zebra induce chiaramente effetti qualitativamente sovrapponibili a quelli indotti dal nitrito ambientale (soprattutto quelli a nitrito 2 mM) sui livelli muscolari di ammonio-N, urea-N, nitrito-N e lattato, nonché sull'attività arginasi.

L'aumento di nitrito-N muscolare osservato in queste condizioni, può essere il risultato di un eccesso di produzione di NO indotto dall'ipossia. In carassio si osserva un effetto limitato; in particolare i livelli di nitrito-N, urea-N e lattato muscolare, che in seguito ad ipossia funzionale (2mM  $NO_2^-$ ) aumentavano, rimangono invariati.

Particolarmente rilevante è, in entrambe le specie, la stimolazione dell'arginasi muscolare con aumento dei livelli di urea ematica. Ancora una volta le risposte sono più ampie e intense in pesce zebra che in carassio dorato.

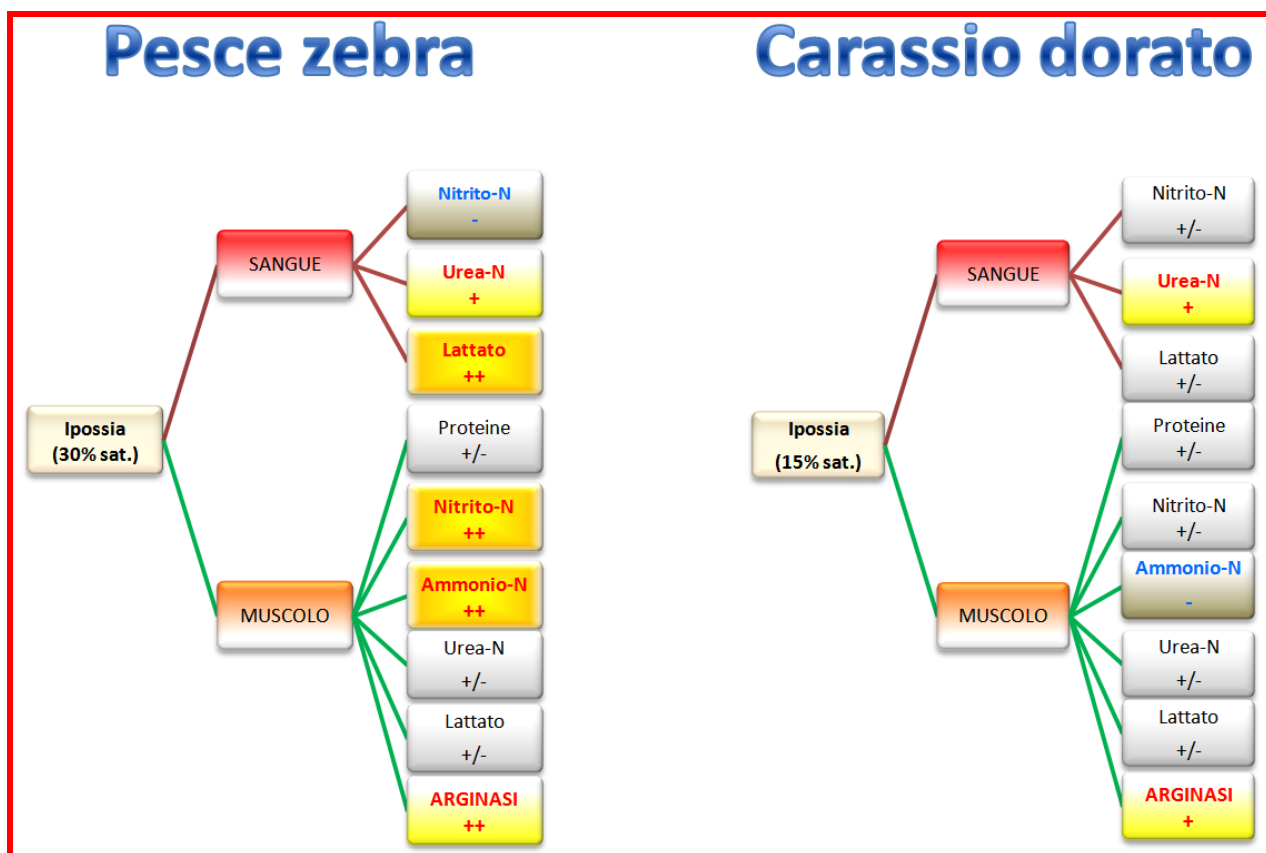


Figura 5.7- Rappresentazione schematica dei principali effetti sui livelli ematici e muscolari di nitrito-N, ammonio-N, urea-N e lattato, delle proteine muscolari e dell'arginasi muscolare rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da ipossia ambientale severa. ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

Da notare che in pesce zebra la stimolazione dell'attività arginasica indotta da ipossia è decisamente maggiore di quella indotta dal nitrito (Fig. 4.16 e 4.26). Nonostante ciò, sia l'escrezione che l'accumulo di urea sono minori rispetto ai gruppi trattati con nitrito. È possibile che ciò sia un segno di una riduzione nella disponibilità del substrato, arginina, il che concorderebbe sia con l'aumento dei livelli di ammonio che con l'aumentato livello del nitrito muscolare (per aumentata produzione di NO) (Chang, 1998; Wu e Morris, 1998).

Sorprendentemente, la combinazione del trattamento con nitrito 10  $\mu\text{M}$  e ipossia ambientale severa (Fig. 5.8) porta ad un forte aumento dell'escrezione azotata, con incremento sia di  $M_{\text{amm-N}}$  che di  $M_{\text{urea-N}}$ . Questo effetto si osserva anche con nitrito 2 mM, ma solo nel carassio dorato. È difficile al momento interpretare questi risultati, tuttavia appare evidente che l'alterazione dell'omeostasi  $\text{NO}_2^-$ -NO-Hb indotta dal nitrito 10  $\mu\text{M}$  ha forti effetti sul catabolismo proteico. Inoltre, mentre la sola ipossia severa induce in pesce zebra aumenti di lattato e urea ematici e di



nitrito e ammonio muscolari, nonché un aumento dell'arginasi (Fig. 5.7), la combinazione con il trattamento con nitrito 10  $\mu$ M (Fig. 5.9) lascia come unica variazione endogena misurata l'aumento dell'attività arginasica, che ben si correla con l'aumento di escrezione di urea (Fig. 5.8), suggerendo un stimolazione dell'arginolisi. E' possibile che questo fenomeno abbia effetti protettivi, e che in queste condizioni siano stimolati i processi di trasporto epiteliale a livello branchiale (Rh e UT, Mistry et al., 2001; Braun et al., 2009b; Mathai, 2005; Weihrauch et al., 2009).

In carassio dorato l'aumentata escrezione di urea (Fig. 5.8) e i maggiori livelli ematici di urea (Fig. 5.9) non sono associati ad un aumento dell'arginasi muscolare. E' possibile che in queste condizioni altri organi contribuiscano alla produzione di urea (ad es. fegato).

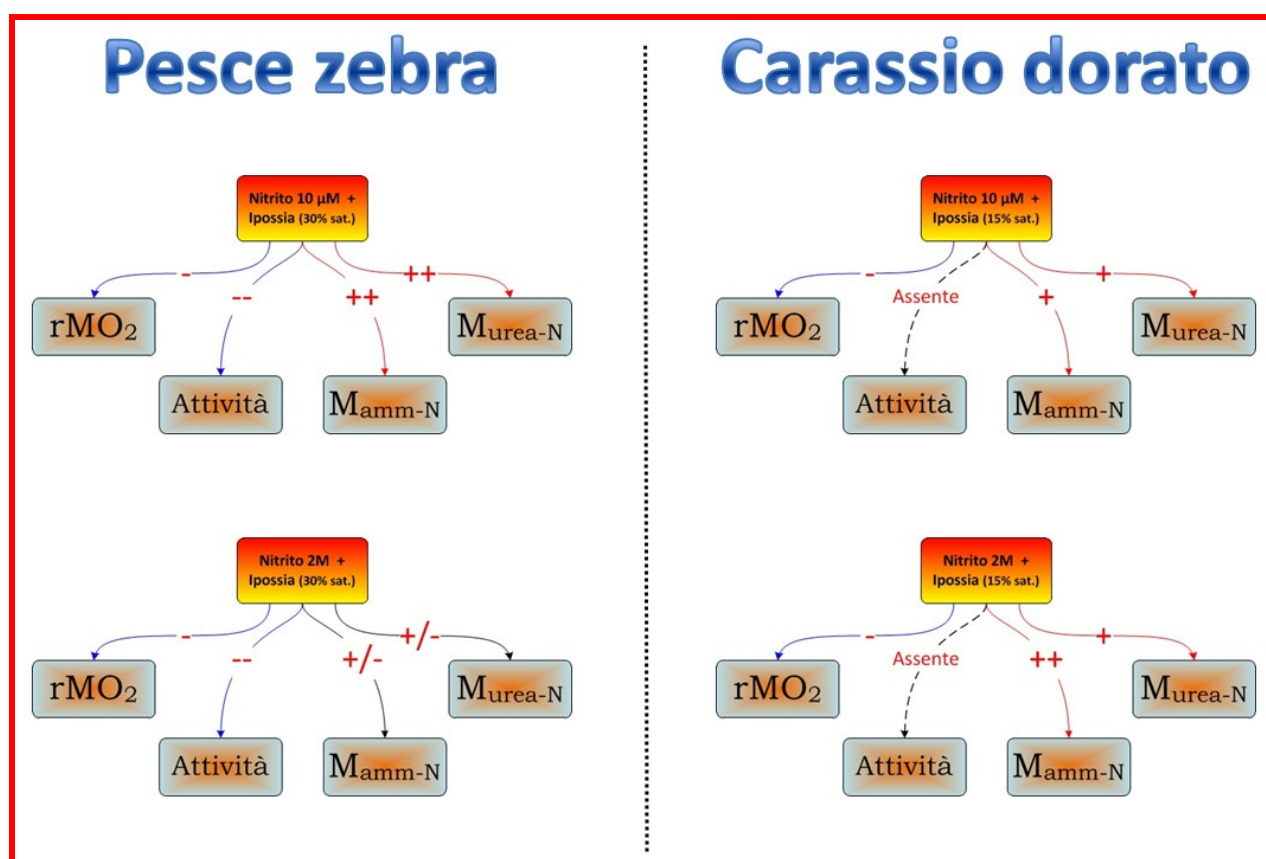


Figura 5.8 - Rappresentazione schematica dei principali effetti metabolici rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da nitrito ambientale combinato con ipossia ambientale severa. Anche in questo caso, sebbene non sia stato possibile misurare il consumo di ossigeno in queste condizioni, si assume che l'ipossia severa, in base a osservazioni precedenti e dati della letteratura (Agnisola e Femiano, 2006; Nilson, 2000), che in entrambe le specie si abbia una significativa riduzione di  $rMO_2$  indotta dall'ipossia severa. Tuttavia, questa assunzione richiede conferma sperimentale, poiché misure di consumo di ossigeno in ipossia severa e in presenza di nitrito non sono state mai effettuate. + aumento; - riduzione; +/- effetto scarso o assente.



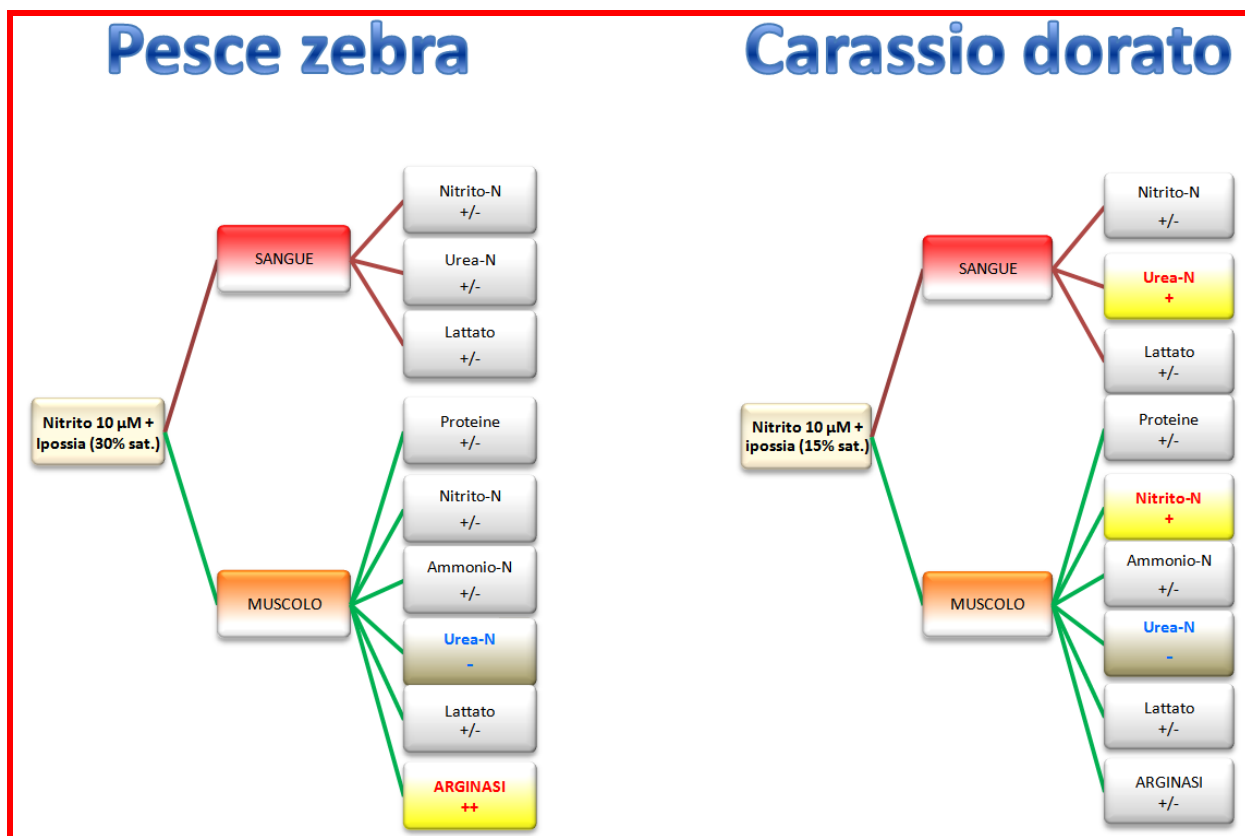


Figura 5.9 - Rappresentazione schematica dei principali effetti sui livelli ematici e muscolari di nitrito, ammonio-N, urea-N e lattato, delle proteine muscolari e dell'arginasi muscolare rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da ipossia ambientale severa concomitante con lo stress da nitrito 10 µM. ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

La combinazione di ipossia ambientale e stress da nitrito 2 mM porta ad una riduzione, piuttosto che ad un aumento, dell'arginasi muscolare in pesce zebra (Fig. 5.10). Ciò potrebbe spiegare il mancato aumento dell'escrezione ureica in queste condizioni (Fig. 5.8), nonché la riduzione dei livelli muscolari di urea. In carassio dorato, invece, si mantiene la stimolazione della produzione di lattato (indice di metabolismo anaerobico) e l'accumulo di urea nel sangue. Appare particolarmente significativo il fatto che lo stress combinato (in carassio dorato già con nitrito 10 µM) blocca la stimolazione dell'arginasi, un risultato il cui significato rimane, tuttavia, da approfondire.

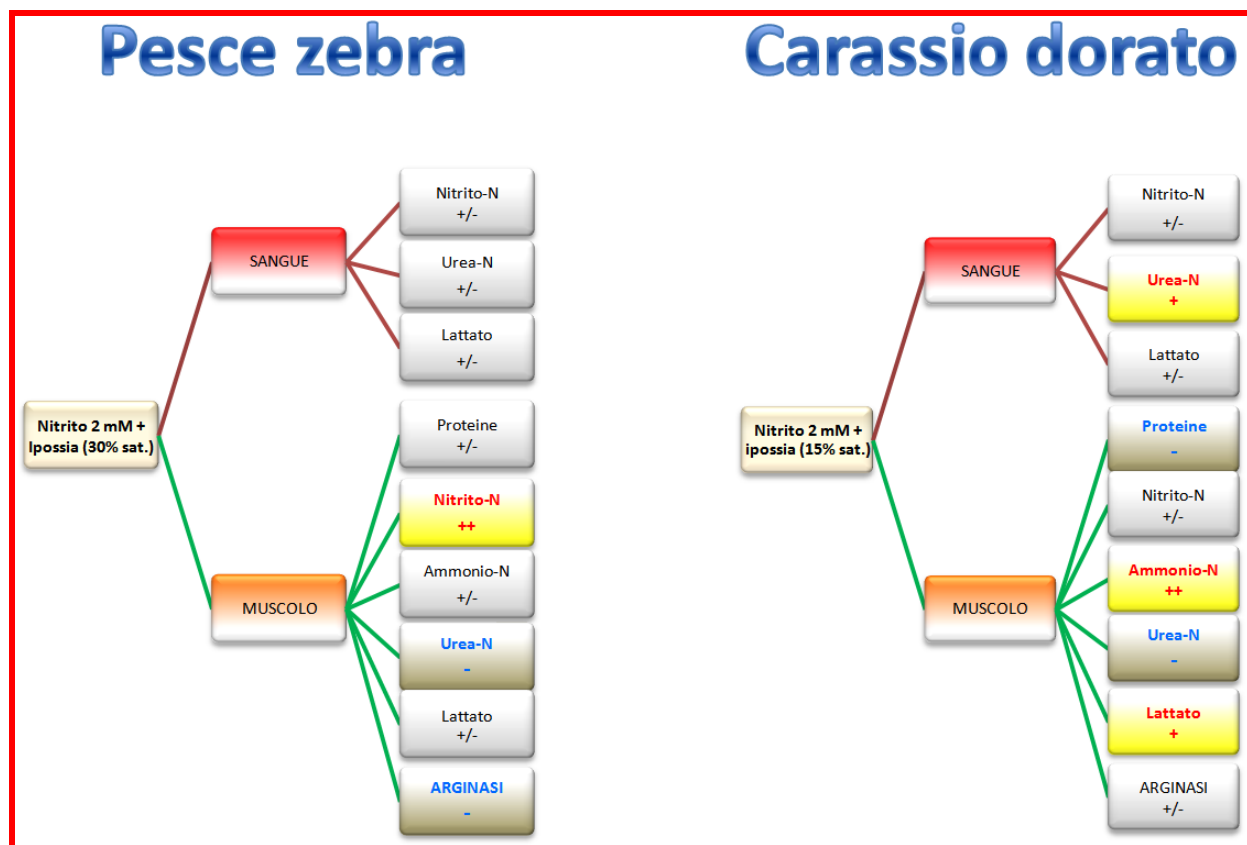


Figura 5.10 - Rappresentazione schematica dei principali effetti sui livelli ematici e muscolari di nitrito-N, ammonio-N, urea-N e lattato, delle proteine muscolari e dell'arginasi muscolare rilevati in pesce zebra e carassio dorato in seguito a stress da ipossia ambientale severa concomitante con lo stress da nitrito  $10 \mu\text{M}$ . ++ forte aumento; + aumento; - riduzione; -- forte riduzione; +/- effetto scarso o assente.

## 6. Conclusioni

Il presente studio ha dimostrato che l'escrezione azotata nei teleostei è ampiamente modulata in relazione alle variazioni dei fattori ambientali che sfidano la tolleranza e la capacità di sopravvivenza degli animali a fronte di tali variazioni.

Tuttavia, le risposte osservate non sono univoche e tendono ad essere specifiche a seconda del tipo di stress, della sua intensità e della combinazione con altri stress. Inoltre, chiaramente, specie diverse rispondono in maniera diversa, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, ed è possibile che tale variabilità di specie si correli con la tolleranza di una specie ad un dato stressogeno.

Il risultato più significativo di questo studio è rappresentato dalla stimolazione dell'escrezione ureica, con l'urea che diventa il principale prodotto dell'escrezione azotata. Questa risposta è stata osservata solo in gambusia in risposta agli stress da temperatura e salinità, e sia in pesce zebra che in carassio dorato in seguito a ipossia funzionale o ambientale, e che appare essere la più generalizzata delle risposte osservate.

La risposta allo stress da ipossia, sia funzionale che ambientale, ha dimostrato che l'aumentata escrezione ureica si può associare ad aumento dei livelli endogeni di urea, sia a livello ematico che muscolare (con variazioni diverse a seconda dello stress e della specie) e alla stimolazione dell'arginasi muscolare, suggerendo che lo stress stimoli prevalentemente l'arginolisi. Rimane da stabilire quanto questa risposta sia importante ai fini della tolleranza agli stress ambientali nei teleostei di acqua dolce. L'arginasi è considerato un importante enzima regolatore, con ruoli differenti in tessuti differenti e organismi differenti, attraverso la modulazione della disponibilità di arginina per la sintesi di NO, poliammine, agmatina (nei mammiferi), prolina e glutammina (Wu e Morris, 1998). Con l'eccezione dell'agmatina, queste vie di degradazione dell'arginina sono state tutte descritte nei teleostei (Walh e Mommsen, 2001). Riguardo all'urea, sebbene sia considerato principalmente un prodotto di scarto, con potenziali effetti negativi a concentrazioni elevate (50 mM), è stato descritto avere effetti complessi, quali la capacità di inibire il trasporto di arginina nelle cellule endoteliali favorendone l'entrata negli eritrociti (Xiao et al. 2001), la capacità di agire da antiossidante non enzimatico (Ballantine, 2004) e protettivo verso i danni a livello di DNA (Kultz e Chakravarty, 2000), di inibire la G6PD eritrocitaria (Erdogan et al., 2005), di inibire l'induzione di iNOS nei macrofagi (Moeslinger e Spieckermann, 2001), di inibire l'anidrase carbonica (ArasHisar et al., 2004), e di avere effetti cardio-protettivi sul tessuto miocardico (Wang et al., 1999). Molti di questi effetti potrebbero interferire con l'omeostasi

dell'argina e dell'NO, con effetti funzionali complessi, che potrebbero suggerire un ruolo funzionale dell'aumento di produzione di urea in condizioni di stress.

Questi risultati richiedono, pertanto, ulteriore sviluppo per verificare:

- 1) la generalità della risposta ureica allo stress ambientale nei teleostei d'acqua dolce;
- 2) i meccanismi di questa risposta, ed il particolare il ruolo giocato dalla stimolazione arginasica, e l'eventuale coinvolgimento di altre vie di sintesi dell'urea (uricolisi e ciclo dell'urea);
- 3) l'eventuale ruolo funzionale dell'aumentata produzione di urea;
- 4) il possibile coinvolgimento della risposta da stress generalizzata, e, quindi, degli ormoni da stress, adrenalina e cortisolo.

## **Appendice**



**NOME SCIENTIFICO:** *Danio rerio*

**Ordine :** Cypriniformes

**Famiglia :** Cyprinidae

*Danio rerio* appartiene alla famiglia dei ciprinidi e proviene dalle regioni orientali dell'India, dove vive in bassi acquitrini ed acque correnti alla temperatura di 24°-28°C. Si tratta di una specie di piccole dimensioni, snello, fortemente compresso ai fianchi, munito di due paia di barbigli. Presenta una colorazione dal verde oliva al marroncino sul dorso, i fianchi di un azzurro lucente con quattro strisce longitudinali di uno splendido color oro; ventre bianco-giallognolo, striature azzurro-oro anche sulla pinna anale. La pinna dorsale è gialla alla base, poi azzurra con la punta bianca; l'iride è rosso oro, l'opercolo è azzurro con macchie e strisce dorate. Ha dimensioni che possono sfiorare i 5-6 cm di lunghezza. Il maschio e la femmina di questa specie sono facilmente distinguibili, in quanto quest'ultima è più vistosamente argentata e diventa più grossa. L'optimum per la temperatura si ha fra i 18-24°C; 24°C per la riproduzione. La deposizione delle uova avviene dopo qualche giorno di corteggiamento, e gran parte di esse verranno divorate dagli stessi riproduttori. Le uova che non vengono divorate si schiuderanno dopo qualche giorno e gli avannotti rimarranno attaccati alle foglie delle piante. Essi nuoteranno liberamente solo dopo circa una settimana localizzandosi principalmente sotto la superficie dell'acqua. Non presenta particolari esigenze nutrizionali.



**NOME SCIENTIFICO:** *Gambusia affinis*

**ORDINE :** Cyprinodontiformes

**FAMIGLIA:** Poeciliidae

Gambusia è caratterizzata da un evidente dimorfismo sessuale. La femmina raggiunge una dimensione di 5-6 cm, circa doppia quella del maschio. Il colore in entrambi i sessi è grigio-olivastro con la regione ventrale bianca. Nella femmina, in vicinanza della pinna anale, è caratteristica una macchia nera, più evidente durante la gravidanza. Nel maschio è tipico il gonopodio, una modificazione stiliforme della pinna anale utilizzata durante l'accoppiamento. Specie ovovivipara, può partorire fino a 100 avannotti per parto in rapporto di 1:1 tra i sessi (Geiser, 1924; Dulzetto, 1934 - cit. in Bisazza *et al.*, 1990) portando a termine negli ambienti temperati 4-5 gravidanze per stagione. Esiste una correlazione tra peso, lunghezza, luogo di origine delle femmine e il numero di embrioni prodotti (Naama e Al-Hassan, 1989). La temperatura ottimale per la crescita degli avannotti, nel caso di buona disponibilità di cibo, è compresa tra 25 e 35°C; ma in condizioni alimentari limitate, scende a 25°C (Wurtsbaugh e Cech Jr., 1983). Nell'Italia Nord-orientale Bisazza *et al.* (1990) hanno studiato la biologia riproduttiva di *G. holbrooki* confrontando popolazioni presenti in biotopi con diverse caratteristiche. Nelle stazioni alimentate con acqua termale, dove in inverno la temperatura dell'acqua non scende al di sotto dei 15°C, le gambusie restano in attività tutto l'anno ed entrano in riproduzione tra i mesi di febbraio e marzo. Negli ambienti dove la temperatura dell'acqua si abbassa fino al congelamento, trascorrono un periodo di quiescenza invernale e la riproduzione inizia nel mese di maggio. In tutti gli ambienti considerati, l'attività riproduttiva termina in ottobre. Il fotoperiodo e la temperatura sono fattori che influenzano lo sviluppo delle gonadi e l'inizio del periodo riproduttivo anche se il fotoperiodo, da solo, sembra avere un peso maggiore. Un altro fattore che influenza la fertilità è la disponibilità alimentare (Vondracek *et al.*, 1988 - cit. in Bisazza, 1990). In prove di laboratorio, alla temperatura costante di 25°C e in condizioni di elevata disponibilità di cibo, il fotoperiodo che consente la minore mortalità di femmine mature e la maggiore prolificità è di 13 ore di luce e 11 di buio oppure, 15 ore di luce e 9 di buio (Cech *et al.*, 1989). Degna di nota è la naturale adattabilità di Gambusia alle varie condizioni ambientali quali la temperatura dell'acqua, il tenore di ossigeno disciolto, la salinità e i possibili inquinanti chimici, verso i quali dimostra sopportare valori elevati. Nei confronti della temperatura dell'acqua Gambusia tollera temperature anche superiori a 35°C (ma entro i 40°C) mentre, come limite inferiore non tollera valori al di sotto dei 6-7°C, Cech, 1987). Nei climi temperati può sopportare temperature invernali anche di diversi gradi sotto zero purché il fondo sia melmoso da consentire l'affondamento nel fango (Ronchetti, 1968). Sorprendente è la capacità di resistenza a bassi livelli di ossigeno disciolto fino a tensioni di circa 7 mmHg (Cech, 1987) e per aumentare gli scambi gassosi con l'aria, quando il livello è molto basso, è in grado di "schiumare" il pelo dell'acqua. Risulta essere in grado di tollerare bene variazioni di salinità dell'acqua, specie se gradualmente. Sperimentazioni di laboratorio hanno dimostrato che una mortalità del 10% si verifica quando la

salinità varia in modo brusco da 0,05% a 1,95%; mentre elevata sopravvivenza si riscontra anche a valori di salinità del 3,9% (acqua di mare) nel caso di un aumento progressivo (Chervinski, 1983). Nei confronti di ammoniaca e nitrati dimostra resistenza a livelli che risultano essere tossici per altre specie (Beesley et. al., 1986).





**NOME SCIENTIFICO:** *Carassius auratus*

**ORDINE :** *Cypriniformes*

**FAMIGLIA:** *Cyprinidae*

Il *Carassius auratus* (“carassio dorato”) è un pesce d’acqua dolce appartenente alla famiglia delle Cyprinidae. E’ un teleosteo (pesce osseo, attinopterio) e pertanto le sue caratteristiche anatomiche principali sono:

- uno scheletro completamente ossificato;
- una vescica natatoria senza connessione con il tratto digerente;
- sulla superficie dei 4 archi branchiali, protetti da un opercolo osseo, si realizza lo scambio dell’ossigeno tra acqua e sangue; i due liquidi scorrono in “controcorrente”;
- scaglie ctenoidi a protezione dell’epidermide;
- pinne pari (pettorali, pelviche, anali) ed impari (dorsale, caudale) sorrette da raggi ossei dello scheletro.

E’ una specie che in natura ed in buone condizioni ambientali raggiunge normalmente una lunghezza di 35 cm e un peso di circa 1 kg; in casi eccezionali raggiunge la lunghezza totale di 45 cm e il peso di circa 3 kg. Se allevato in buone condizioni, il pesce rosso può vivere anche più di 20 anni.

Per via delle immissioni in natura più o meno volontarie da parte dell’uomo, oggi il carassio dorato è da considerarsi un pesce cosmopolita. Lo si ritrova un po’ dappertutto e nei luoghi più impensati, dalle oasi sahariane agli acquitrini della Florida, in tutta Europa Italia compresa, ed in tutto l’estremo Oriente. A favorire la rapida colonizzazione di nuovi ambienti in natura, è il particolare tipo di riproduzione definito “ginogenesi”. L’uovo si sviluppa regolarmente in embrione senza essere stato fecondato ma semplicemente “attivato” dalla penetrazione di uno spermatozoo estraneo, che può provenire da maschi di altre specie (tinche, carpe cavedani) comunque Ciprinidi che dividono con il Carassio gli stessi biotopi. Tutti gli avannotti nati da questa particolare riproduzione sono ibridi, ma tutte le femmine a loro volta sono “proteroginiche”. Questo è il motivo per cui spesso si è osservato un notevole sbilanciamento nel rapporto sui sessi a favore delle femmine; queste ultime possono superare ampiamente il 90% del totale degli individui. A ciò si aggiunge l’alta adattabilità alle più svariate condizioni ambientali, come acque particolarmente inquinate ed a bassissimo contenuto di ossigeno.

L’area di distribuzione originaria si pensa che comprendesse larghe zone dell’Estremo Oriente (Cina, Giappone e Corea), la Siberia e parte dell’Asia centrale. Una leggenda vuole che il pesce rosso sia nato per volere divino in una pozza formata dopo un lungo periodo di siccità in Cina, per informare il popolo che la carestia era finita. Le prime notizie certe di allevamento risalgono al 970 d.c., in Cina sotto la dinastia Song. La famiglia reale, ritenendolo un animale sacro, costruì un grande lago artificiale nei giardini del palazzo di Lin’an. L’esempio fu seguito da dignitari e signori in visita al Palazzo che vollero a tutti i costi allevare e riprodurre nelle loro case e nelle loro province il pesce rosso. Dalla Cina il pesce rosso si diffuse in tutto l’Oriente ed in Giappone dove, introdotto due secoli dopo,

fu oggetto di creazione di bellissime varietà. In Europa, il pesce approdò verso il XVIII secolo; da qui si espanse negli altri Paesi. Il suo allevamento, per un primo commercio ittico, non fu finalizzato all'alimentazione umana, ma questo risulta documentato solo in periodi più recenti. In un primo momento, ci volle una lunga e attenta selezione per creare la specie che è poi quella più comune, seguita da molte altre più rare e dalle forme più strane (*Komiyama et al., 2009*). In Giappone, attraverso varie selezioni, alla fine del 1400 si ottennero finalmente le prime varietà come la “Testa di leone”. In Europa arrivò molto dopo nel 1700; nel frattempo, era stato importato un po' in tutto il mondo adattandosi a diversi habitat, infatti lo troviamo anche alle Hawaii o alle Mauritius. L'introduzione in Europa partì dal Portogallo, ma presto arrivò in Francia e in Inghilterra, qui il primo ad averli fu il duca di Richmond che li fece arrivare in un vaso di terracotta. In quel periodo, i vasi di terracotta erano i primi contenitori dove i pesci erano allevati, solo in seguito la terracotta sarà sostituita dal vetro. Parte della popolarità di questo pesce è dovuta alla sua elevata resistenza: si tratta di un pesce di acqua fredda, che può vivere in un acquario non riscaldato o in una vasca in giardino. Se si trova in uno stagno può sopravvivere perfino a brevi periodi di ghiaccio superficiale, sempre che lo stagno non geli completamente. In natura vive in fiumi, laghi e specchi d'acqua calma, fino ad una profondità massima di 20 metri. Lo ritroviamo spesso in acque stagnanti, molto probabilmente il suo primo habitat naturale, e proprio in queste acque è nota la sua capacità di adattamento ad ambiente ipossico/anossico: questa caratteristica lo rende un importante modello di studio dell'ipossia nei teleostei.

## Bibliografia

1. Agnisola, C. Femiano, S., (2006). Studies on routine metabolism in adult zebrafish, *Danio rerio*. Atti del “The Scandinavian Physiological Society annual Meeting”, Reykjavik, Iceland.
2. Agnisola, C., Pellegrino, D., (2007). Role of nitric oxide in vascular regulation in fish, in: B. Tota, B. Trimmer (Eds.), *Advances in Experimental Biology*, vol. 1, Nitric Oxide, Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 293–310.
3. Aggergaard, S., Jensen, F.B., (2001). Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 59, 13–27.
4. Ajani F., Dawodu M. O., Bello-Olusoji O (2011). Effects of feed forms and feeding frequency on growth performance and nutrient utilization of *Clarias gariepinus* fingerlings (2011) *African Journal of Agricultural Research* Vol. 6(2), pp. 318-322
5. Akin, S., Neill, W., (2003). Routine metabolism of mosquitofish (*Gambusia affinis*) at three different salinities. *Tex. J. Sci.* 55, 255–262.
6. Alam, M.S., Teshima, S., Koshio, S. & Ishikawa, M., (2002). Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters. *Aquaculture*, 205, 127–140.
7. Alcaraz, C., Bisazza, A., Garcia-Berthou, E., (2008). Salinity mediates the competitive interactions between invasive mosquitofish and an endangered fish. *Oecologia* 155, 205–213.
8. Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G., (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593.
9. Anderson, P.M., (1995). Urea cycle in fish: molecular and mitochondrial studies. In: Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds.), *Ionoregulation: Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*, Vol. 14. Academic Press, New York, pp. 57–83 *Fish Physiol.*
10. Anderson, P. M., Walsh, P. J., (1995). Subcellular localisation and biochemical properties of the enzymes of carbamoyl phosphate and urea synthetases in the batrachoidid fish *Opsanus beta*, *Opsanus tau* and *Porichthys notatus*. *J. Exp. Biol.* 198, 755-766.
11. Anderson, P. M., (1981). Purification and properties of the glutamine and N-acetyl-L-glutamate-dependent carbamoyl phosphate synthetase from liver of *Squalus acanthias*. *J. biol. Chem.* 256, 12228–12238.
12. Anderson, P. M., (1980). Glutamine- and N-acetylglutamate-dependent carbamoyl phosphate synthetase in elasmobranchs. *Science* 208, 291–293.

13. Anderson, P. M., (1976). A glutamine- and N-acetyl-L-glutamatedependent carbamyl phosphate synthetase activity in the teleosts *Micropterus salmoides*. Comp. Biochem. Physiol. 54B, 261–263.
14. Angelon, K.A., Petranka, J.W., (2002). Chemicals of predatory mosquito fish (*Gambusia affinis*) influence selection of oviposition site by *Culex* mosquitoes. J. Chem. Ecol. 28, 797–806.
15. Arashisar, S., O. Hisar, T. Yanik and S.M. Aras. 2004. Inhibitory effects of ammonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ Toxicol Pharmacol 17:125-128.
16. Arillo A., Gaino E., Margiocco C., Mensi P., Schenone G., (1984). Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: Liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. Environmental Research, 34, 135–154
17. Augspurger T, Keller AE, Black MC, Cope WG, Dwyer FJ., (2003). Water quality guidance for protection of freshwater mussels (Unionidae) from ammonia exposure. Environ Toxicol Chem; 22:2569–75.
18. Baird, S.F, Girard, C., (1853). Descriptions of new species of fishes collected by Mr. John H. Clark, on the U.S. and Mexican boundary survey, under Lt. Col. Jas. D. Graham. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 6, 387–390.
19. Ballantyne, J. S. (2004) Mitochondria: aerobic and anaerobic design-lessons from molluscs and fishes Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 139, 461–467.
20. Barimo, J. F. and Walsh, P.J., (2005). The effects of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of the gulf toadfish, *Opsanus beta* Aquatic Toxicology 7, 225–237.
21. Barton, B. A., (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids, Int. and Comp. Bio, 42:517–525.
22. Bath, R. N.; Eddy, F. B., (1980). Transport of nitrite across fish gills. J. Exp. Zool., 214, 119-121.
23. Beamish FWH., (1978). Swimming capacity. In: Hoar WS, Randall DJ (eds) Fish physiology, vol 7. Academic, New York, pp 101–187.
24. Benamar, A., Rolletschek, H., Borisjuk, L., Avelange-Macherel, M.-H., Curien, G., Mostefai, H. A., Andriantsitohaina, R. and Macherel, D., (2008). Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. Biochim. Biophys. Acta 1777, 1268-1275.

25. Beutler, E., (1968): Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism. Grune and Stratton, New York. 185 pp.
26. Bickler, P. E., Buck, L. T., (2007). Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Ann. Rev. Physiol.* 69, 145-170.
27. Boisen, A. M. Z.; Amstrup, J.; Novak, I.; Grosell, M. (2003). Sodium and chloride transport in soft water and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1618, 207-218.
28. Boutilier, R.G., St-Pierre, J., (2000). Surviving hypoxia without really dying *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 126, 481–490.
29. Braun, M.H., S.L. Steele, M. Ekker and S. Perry. (2009a). Nitrogen excretion in developing zebrafish (*Danio rerio*): A role of Rh proteins and urea transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F994-F1005.
30. Braun, M.H., S.L. Steele and S.F. Perry., (2009b). The responses of zebrafish (*Danio rerio*) to high external ammonia and urea transporter inhibition: nitrogen excretion and expression of rhesus glycoproteins and urea transporter proteins. *J Exp Biol* 212:3846-3856.
31. Brett, J., (1987). Environmental factors affecting growth. In: Hoare, W.H., Randall, D.J., Brett, S.R. (Eds.), *Fish Physiology*, vol. 8. Academic Press, pp. 252– 259.
32. Brett, J., Groves, T., (1979). Physiological Energetics. In: Hoar, W.S., Randall, D., Brett, J.R. (Eds.), *Fish Physiology - Bioenergetics and growth*. Academic Press, New York, pp. 279–352.
33. Boutilier, R.G. Pierre, J., (2000). Surviving hypoxia without really dying, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 126, 481–490.
34. Brown, G. W, Jr., Cohen, P. P., (1960). Comparative biochemistry of urea synthesis. Vol. 3. Activities of urea-cycle enzymes in various higher and lower vertebrates. *Biochem. J.* 75: 82 – 91.
35. Bryan, N. S. and Grisham, M. B., (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 645-657.
36. Burgetz, Ingrid, J., Rojas-Vargas, Anibal, Hinch, Scott, G. and Randall, David J. (1998) Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology* 201, 2711–2721.
37. Camargo, J. A., Alonso, A., (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment, *Environment International* 32, 831–849.

38. Cameron J.N., (1971). Methaemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology*, 40, 743–749.
39. Campbell NA. *Biology.*, (1990). 2nd edition. Redwood (CA): Benjamin/Cummings Publishing Company.
40. Cannon, R.O., Kelm, M., Wink, D.A, Espey, G.E., Oldfield, E.H., Pluta, R.M., Freeman, B.A., Lancaster, J.R. Feelish, M., Lundberg, J.O., (2005). The emerging biology of the nitrite anion, *Nat. Chem. Biol.* 1 308–314.
41. Castello, P.R., David, P.S., McClure, T., Crook, Z., Poyton, R.O., (2006). Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes, *Cell Metab.* 3,277–287.
42. Chang, C.I., J.C. Liao and L. Kuo., (1998). Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274:H342-8.
43. Cheng S-Y, Chen J-C., (2002). Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid–base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicol*;61: 181–93.
44. Chervinski J., (1983). Salinity tolerance of the mosquito fish, *Gambusia affinis* (Baird and Girard). *J. Fish Biol.*, 22: 9-11.
45. Chiu, Y.N., Austic, R.E., Rumsey, GL., (1986). Urea cycle activity and arginine formation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* 116, 1640-1650.
46. Cho, C. Y., and Kaushik, S. J., (1990). *World Rev. Nutr. Diet.* 61, 132 – 172.
47. Cıciık, B., and Engin, K., (2005). The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758), *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 13-117.
48. Claireaux, G. Webber, D. M., Lagardère, J. -P. Kerr, S. R., (2000). Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*) *Journal of Sea Research* 44, 257±265.
49. Clarke, A., and Johnson, N. M., (1999). *J. Anim. Ecol.* 68, 893 – 905.
50. Constable M, Charlton M, Jensen F, McDonald K, Craig G, Taylor KW., (2003). An ecological risk assessment of ammonia in the aquatic environment. *Hum Ecol Risk Assess*; 9:527–48.
51. Cosby, K., Partovi, K.S., Crawford, J.H., Patel, R.P, Reiter, C.D., Martyr, S., Yang, B.K., Waclawiw, M.A, Zalos, G., Xu, X., Huang, K.T., Shields, H., Kim-Shapiro, D.B.,

- Schechter, A.N. Cannon III, R.O., Gladwin, M.T., (2003) Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation, *Nat. Med.* 9, 1498–1505.
52. Crawford R.E., Allen G.H., (1977): Seawater inhibition of nitrite toxicity to chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106, 105–109.
53. Dalla Via, J., Van den Thillart, G., Cattani, O. and de Zwaan, A., (1994). Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 111, 17-27.
54. Diaz, R. J., (2001). Overview of Hypoxia around the World. *Journal of Environmental Quality* 30: 275 - 281.
55. Dickson K.A, Donley J.M, Sepulveda C., Bhoopat L., (2002). Effects of temperature on sustained swimming performance and swimming kinematics of the chub mackerel *Scomber japonicus*. *J Exp Biol*, 205:969.
56. Doblander, C., Lackner, R., (1997). Oxidation of nitrite to nitrate in isolated erythrocytes: a possible mechanism for adaptation to environmental nitrite, *Can. J. Fish. Aquat Sci.* 54 157–161.
57. Driedzic WR, Hochachka PW., (1976). Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am J Physiol* 230:579–582.
58. Dunn, J. F., and P. W. Hochachka, (1986). Metabolic responses of trout (*Salmo gairdneri*) to acute environmental hypoxia. *J. Exp. Biol.* 123: 229–242.
59. Eddy FB, Williams EM., (1987). Nitrite and freshwater fish. *Chem Ecol* ;3:1-38.
60. Eddy F.B., Kunzlik P.A., Bath R.N. (1983): Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in fresh water and in dilute sea water. *Journal of Fish Biology*, 23, 105–116.
61. Erdogan, O., O. Hisar, G. Koroglu and A. Ciltas. 2005. Sublethal ammonia and urea concentrations inhibit rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol* 141:145-150.
62. Evans, D. H., Piermarini, P. M., CHOE, K.P., (2005). The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid base regulation and excretion of nitrogen waste. *Physiol Rev* 85: 97–177.
63. Evans DH, Claiborne JB., (2005). *The physiology of fishes*, Taylor & Francis Group, New York, USA, 601.
64. Evans, D. H., (1984). The roles of gill permeability and transport mechanisms in euryhalinity. In W. S . Hoar and D. J. Randall (eds.), *Fish physiology*, pp. 239–283. Academic Press, New York.

65. Farmer, G., Ritter, J.A., Ashfield, D., (1978). Seawater transformation and parr–smolt transformation of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. J. Fish. Res. Board Can. 35, 93–100.
66. Farrell AP, Sobin SS, Randall DJ Crosby S., (1980). Intralamellar blood flow patterns in fish gills. Am J Physiol. 239:428-436.
67. Fernandes and Rantin, (1989). Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* to environmental hypoxia under different thermal conditions., Journal Fish Biol., 35, 509-519.
68. Fiess, J.C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L.G., Yancey, P.H., Hirano, T., Grau, E.G., (2007). Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Comp. Biochem. Physiol. 146, 252–264.
69. Fontenot Q.C., Isely J.J., (1999). Characterization and inhibition of nitrite uptake in shortnose sturgeon fingerlings. Journal of Aquatic Animal Health, 11, 76–80.
70. Fournier V., Gouillou-Coustans M.F., Métailler R., Vachot C., Moriceau J., Le Delliou H., Huelvan C., Desbruyeres E., Kaushik S.J., (2003). Excess dietary arginine affects urea excretion but does not improve N utilisation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and turbot *Psetta maxima*. Aquaculture 217, 559–576.
71. Fournier, V., Gouillou-Coustans M.F., Metailler, R., Vachot, C., Moriceau, J, H. Huelvan, Le Delliou C, Desbruyeres, E. and. Kaushik, S.J., (2002). Nitrogen utilisation and ureogenesis as affected by dietary nucleic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*) Fish Physiology and Biochemistry 26: 177–188.
72. Foster, M. W., Hess, D. T. and Stamler, J. S. (2009). Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. Trends Mol. Med. 15, 391-404
73. Fraser, K. P. P., Houlihan, D. F., Lutz, P. L., Leone-Kabler, S., Manuel, L. and Brechin, J. G., (2001). Complete suppression of protein synthesis during anoxia with no post-anoxia protein synthesis debt in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta elegans*. J. Exp. Biol. 204, 4353-4360.
74. Freire, C.A., Amado, E.M., Souza, L.R., Veiga, M.P.T., Vitule, J.R.S., Souza, M.M., Prodócimo, V., (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. Comp. Biochem. Physiol. 149A, 435–446.



75. Frick, N.T., Wright, P.A., (2002). Nitrogen metabolism and excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus* I. The influence of environmental salinity and external ammonia. *J. Exp. Biol.* 205, 79–89.
76. Fritsche, R. and Nilsson, S., (1993). Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. In *Fish Ecophysiology* (ed. J. C. Rankin and F. B. Jensen), pp. 180–206. London: Chapman & Hall.
77. Fry, F., (1957). The aquatic respiration of fish. In: Brown, M. (Ed.), *The Physiology of fishes*. Academic Press, New York, pp. 1–63.
78. Fry, F.E.J., (1947). Cruising speed of goldfish in relation to water temperature. *J. Fish. Res. Bd Can.* 7, 169–175.
79. Fuentealba Gonzalez P., Llanos-Rivera A., Carvajalaeza, N., Uribe Perez, E., (2011). Xenobiotic- Induced changes in the arginase activity of zebrafish (*Danio Rerio*) Eleutheroembryo *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 30, No. 10, pp. 2285–2291.
80. Fuiman L., Batty R., (1997). What a drag it is getting cold: partitioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming. *J. Exp. Biol.* 200:1745.
81. Fulton, T. W., (1902). The rate of growth of fishes. 20th Annual Report of the Fishery Board of Scotland (3):326-446.
82. Gaino, E., Arillo, A., Mensi, P., (1984). Involvement of the gill chloride cells of trout under acute nitrite intoxication. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A, 611–617.
83. Giesy, J. P. (1988). Phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Relationship with condition factor and blood cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A:367–377.
84. Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293, 2248–2251.
85. Gisbert, E., Rodriguez, A., Cardona, L., Huertas, M., Gallardo, M.A., Sarasquete, C., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Sanchez J., Castello-Orvay, F., (2004). Recovery of Siberian sturgeon yearlings after an acute exposure to environmental nitrite: changes in the plasmatic ionic balance, Na<sup>+</sup>–K<sup>+</sup> ATPase activity, and gill histology. *Aquaculture* 239, 141–154.
86. Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Kim-Shapiro, D.B., Patel, R.P., Hogg, N., Shiva, S.,
87. Goldstein L, Forster RP., (1971). Osmoregulation and urea metabolism in the little skate *Raja erinacea*. *Am J Physiol* 220:742–746.

88. Goldstein L, Forster RP., (1965). The role of uricolysis in the production of urea by fishes and other aquatic vertebrates. *Comp Biochem Physiol*;14:567–76.
89. Gornall, A. G., Bardawill, C. J., Maxima, M. D., (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766.
90. Gouillou-Coustans, M.F., Fournier, V., Metailler, R., Vachot, C., Desbruyeres, E., Huelvan, C., Moriceau, J., Le Delliou, H., Kaushik, S.J., (2002). Dietary arginine degradation is a major pathway in ureagenesis in juvenile turbot (*Psetta Maxima*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 132 (2) , 305-319.
91. Graham H. Pyke, (2005). A review of the biology of *Gambusia affinis* and *G. holbrooki* *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 339–365 DOI 10.1007/s11160-006-6394-x.
92. Graham M., (1987). The solubility of oxygen in physiological salines. *Fish Physiol Biochem* 4: 1±4.
93. Grosell, M., Jensen, F.B., (2000). Uptake and effects of nitrite in the marine teleosts fish *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* 50, 97–107.
94. Guillemin, K., Krasnow, M.A., (1997). The hypoxic response: HIFing and HIFing. *Cell* 89, 9–12.
95. Hamilton-Buchanan, F., (1822). *An Account of the Fishes of River Ganges and its Branches*. George Ramsay and Co., London.
96. Haney, D.C., Nordlie, F.G., (1997). Influence of environmental salinity on routine metabolic rate and critical oxygen tension of *Cyprinodon variegatus*. *Physiol. Zool.* 70, 511–518.
97. Hansen M. N., Jensen, F.B., , (2010). Nitric oxide metabolites in goldfish under normoxic and hypoxic conditions *The Journal of Experimental Biology* 213, 3593-3602.
98. Harper, C., and Wolf, J. C. (2009). Morphologic Effects of the Stress Response in Fish, *ILAR Journal*, 50, 387-396.
99. Harris, R.R., Coley, S., (1991). The effects of nitrite on chloride regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana (Crustacea: Decapoda). *J. Comp. Physiol. B* 161, 199–206.
100. Hayashi, S.; Fujiwara, S.; Noguchi, T., (1989). Degradation of uric acid in fish liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.*, 264, 3211-3215.
101. Hazel RJ, Prosser CL.(1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol Rev.* 54: 620-688.

102. Hill, B. G., Dranka, B. P., Bailey, S. M., Lancaster, J. R. and Darley-Usmar, V. M., (2010). What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* 285, 19699-19704.
103. Hilmy, A. M., N. A. El-Domiaty, and K. Wershana., (1987). Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C:247–253.
104. Holliday, F.G.T., (1969). The effects of salinity on the eggs and larvae of teleosts. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Excretion, Ionic Regulation and Metabolism. Fish Physiology*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 239– 309
105. Holliday, F.G.T., Blaxter, J.H.S., (1960.) The effects of salinity on the developing eggs and larvae of the herring. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 39, 591– 603. 17 :31-65.
106. Huang, C. Y., Chen, J. C., (2002). Effects on acid-base balance, methaemoglobinemia and nitrogen excretion of European eel after exposure to elevated ambient nitrite *Journal of Fish Biology* 61, 712–725.
107. Huertas M., Gisbert, E., Rodriguez, A., Cardona L., Williot, P., Castello-Orvay, F.(2002) Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC50) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues, *Aquatic Toxicology* 57 257–266.
108. Huey D.W., Beitinger T.L., (1980b). Toxicity of nitrite to larvae of the salamander, *Ambystoma texanum*. *Bull Environ Contam Toxicol* 25:909-912.
109. Huggins, A.K, Skutch G., Baldwin E., (1969). Ornithine-urea cycle enzymes in teleostean fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 28, 587-602.
110. Hunter, A., (1929). Further observations on the distribution of arginase in fishes. *J. Biol. Chem.* 81 :505-511.
111. Husson, A., C. Brasse-Lagnel, A. Fairand, S. Renouf and A. Lavoinne., (2003). Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem* 270:1887-1899.
112. Ip YK, Chew SF, Randall DJ., (2001). Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. In: Wright PA, Anderson PM, editors. *Fish physiology*, Vol 20: nitrogen excretion. New York: Academic Press. p 109–148. Jackson, D.C., (1968). Metabolic depression and oxygen depletion in the diving turtle. *J. Appl. Physiol.* 24, 503–509.
113. Iwata, K., Kajimura, M., and Sakamoto, T., (2000). Functional ureogenesis in the gobiid fish *Mugilogobius abei*. *J. Exp. Biol.* 203, 3703–3715.
114. Jensen, F.B., (2009) The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective *Biochimica et Biophysica Acta* 1787, 841–848.

115. Jensen, F.B. (2007). Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality, Proceedings of the Ninth International Symposium, 119-132, EPA/600/R-07/010, Capri, Italy, April 24-28.
116. Jensen FB., (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol*;135A:9-24.
117. Jensen, F.B., Koldkjær, P., Bach, A., (2000). Anion uptake and acid–base and ionic effects during isolated and combined exposure to hypercapnia and nitrite in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *J. Comp. Physiol. B* 170, 489–495.
118. Jensen, F.B., (1996). Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquat. Toxicol.* 34, 95–104.
119. Jensen, F. B., Andersen, N. A. and Heisler, N. (1987). Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol. B* 157, 533-541.
120. Jobling, M., (1981). The influence of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. *J. Fish Biol.* 18, 385–400.
121. Johnston, I. A., Bernard, L. M., (1983). Utilization of the ethanol pathway in carp following exposure to anoxia. *J. exp. Biol.* 104, 73-78.
122. Jow, L. Y., Chew, S. F., Lim, C. B., Anderson, P. M. and Ip, Y. K. (1999). The marble goby *Oxyeleotris marmoratus* activates hepatic glutamine synthetase and detoxifies ammonia to glutamine during air exposure. *J. Exp. Biol.* 202, 237-245
123. Kaushik, S J, Seiliez, I., (2010). Protein and amino acid nutrition and metabolism *Aquaculture Research*, 41, 322-332.
124. Kaushik, S. J. (1998). *Aquat. Liv. Resources* 11, 211 - 217.
125. Kaushik,S.J., Fauconneau, B., Terrier, L., Gras, J., (1988). Arginine requirement and status assessed by different biochemical indices in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 70, 75-97.
126. Kiese, M., 1974. *Methemoglobinemia: A Comprehensive Treatise*. CRC Press, Cleveland, OH.
127. Kim-Shapiro, D. B., Schechter, A. N. and Gladwin, M. T., (2006). Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 697-705.
128. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Rassaf, T., Schindler, A., Picker, O., Scheeren, T., Gödecke, A., Schrader, J., Schulz, R., (2003). Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 790-796.

129. Koumoundouros G, Pavlidis M, Anezaki L, Kokkari C, Sterioti A, Divanach P, Kentouri M (2002). Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae) : critical sensitive ontogenetic phase. J Exp Zool 292 : 573–579.
130. Korsmeyer KE, Dewar H, Lai NC, Graham JB, (1996). Tuna aerobic swimming performance: physiological and environmental limits based on oxygen supply and demand. Comp Biochem Physiol B 113:45–56.
131. Knudsen, P.K., Jensen, F.B., (1997). Recovery from nitrite-induced methaemoglobinaemia and potassium balance disturbances in carp. Fish Physiol. Biochem. 16, 1–10.
132. Kong, H., Edberg, D. D., Korte, J. J., Salo, W. L., Wright, P. A. and Anderson, P. M. (1998). Nitrogen excretion and expression of carbamoyl-phosphate synthetase III activity and mRNA in extrahepatic tissues of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Arch. Biochem. Biophys. 350, 157–168.
133. Krebs, H. A Henseleit K., Untersuchungenuber die Harnstoffbildung im Tierkorper. Zeit. Physiol. Chem., 210, 1932, 33-66.
134. Kroupova, H. Machova, J., Piackova, V., Blahova, J., Dobsikova, R., Novotny, L. Svobodova, Z., (2008). Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Ecotoxicology and Environmental Safety 71, 813–820.
135. Kroupova, H., Machova, J., Svobodova, Z., (2005). Nitrite influence on fish: a review, Vet. Med. – Czech, 50, (11): 461–471.
136. Kultz and Chakravarty (2000) Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells Edited by George N. Somero, Stanford University, Pacific Grove, CA, and approved December 5, 2000
137. Lewis WM, Morris DP., (1986). Toxicity of nitrite to fish: a review. Trans Am Fish Soc;115:183–95.
138. Linnaeus, C., (1758). Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordinus, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. Impensis Direct. Laurentii Salvii, Holmiae. 824 p.
139. Liu, J., Cui, Y., and Liu, J., (2000). Resting metabolism and heat increment of feeding in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and Chinese snakehead (*Channa argus*). Comp. Biochem. Physiol. 127a, 131 - 138.

140. Lucas, M.C., Priede, I.G., (1992). Utilization of metabolic scope in relation to feeding and activity by individual and grouped zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton - Buchanan). *J. Fish Biol.* 41, 175–190.
141. Lumsden, J. S., Wright, P. A., Derksen, J., Byrne, P. and Ferguson, H. W., (1993). Paralysis in farmed Arctic char (*Salvelinus alpinus*) associated with ammonia toxicity. *Vet. Record* 133, 422–423
142. Maetz, J. and Garcia Romeu, F., (1964). The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a fresh-water fish, *Carassius auratus*: II. Evidence for  $\text{NH}_4^+$  /  $\text{Na}^+$  and  $\text{HCO}_3^-$  /  $\text{Cl}^-$  exchanges. *J. Gen. Physiol.* 47, 1209-1227.
143. Margiocco, C., Arillo, A., Mensi, P. and Schenone, G., (1983). Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and hematological consequences. *Aquat. Toxicol.* 3, 261-270.
144. Marques, I. J., Leito, J. T. D., Spaink, H. P., Testerink, J., Jaspers, R. T., Witte, F., Von Den Berg, S., Bagowski, C. P., (2008). Transcriptome analysis of the response to chronic constant hypoxia in zebrafish hearts. *J. Comp. Physiol. B* 178, 77-92.
145. Marshall, W.S., (2002).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J. Exp. Zool.* 293: 264-283.
146. Marshall and Cohen, (1972). *Journal of Biological Chemistry* 247, 1641-1653.
147. Mathai, J. C. (2005). Ammonotelic teleosts and urea transporters, *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F453-F454, doi:10.1152/ajprenal.00391.2004
148. Mazik, P. M.; Hinman, M. L.; Winklemann, D. A.; Klaine, S. J.; Simco, B. A. (1991). Influence of nitrite and chloride concentrations on survival and hematological profiles of striped bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 120, 247-254.
149. McClelland, G. B. P. Craig, M., Dhekney, K., Dipardo, S., (2006). Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*) *J Physiol* 577.2, 739–751.
150. McCormick, S.D., Naiman, R.J., (1984). Osmoregulation in the brook trout, *Salvelinus fontinalis*: II. Effects of size, age and photoperiod on seawater survival and ionic regulation. *Comp. Biochem. Physiol.*, A 79, 17– 28.
151. Médale, F., and Guillaume, J., (1999). In “Nutrition et alimentation des poissons et des crustacés” (J. Guillaume, S. J. Kaushik, P. Bergot, and R. Métailler, eds.), pp. 87 - 111, Collections Du Labo au Terrain. Éditions INRA, Paris.

152. Millar, T. M., Stevens, C. R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R. and Blake, D. R., (1998). Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions, *FEBS Lett.* 427, 225-228.
153. Mistry, A. C., Honda, S., Hirata, T., Kato, A. and Hirose, S. (2001). Eel urea transporter is localized to chloride cells and is salinity dependent. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R1594-R1604.
154. Mitz, S., Newman, M., (1989). Allometric relationship between oxygen consumption and body weight of mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environ. Biol. Fishes.* 24, 267-273.
155. Moncada, S. and Higgs, E. A., (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147, S193-S201.
156. Montgomery and Wells Recent advances in the ecophysiology of Antarctic notothenioid fishes: metabolic capacity and sensory performances. *Fish Ecophysiology* edited by Rankin and Jensen (1993).
157. Moon, T. W., Johnston, I. A., (1981). Amino acid transport and interconversions in tissue of freshly caught and food deprived plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J Exp Biol.* 19, 653-663.
158. Morgan JD, Iwama GK., (1991). Effects of salinity on growth, metabolism, and ion regulation in juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can J Fish Aquatic.* 48:2083-2094.
159. Moeslinger, T. and P.G. Spieckermann. 2001. Urea-induced inducible nitric oxide synthase inhibition and macrophage proliferation. *Kidney Int Suppl* 78:S2-8.
160. Nagibina GV., (1983). Influence of salinity on the metabolic rate in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in early periods of ontogenesis. In *Physiological Basis of Reproduction of Marine and Anadromous Fish* (Shekhanova, I. A., Klyashtorin, L.B. & Kamenskaya, E.A., eds), pp. 57-61.
161. Navarro, A. and Boveris, A., (2008). Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1534-1544.
162. Nikinmaa, M., (2002). Oxygen-dependent cellular functions - why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133: 1-16.
163. Nilsson G. E., (2007). Gill remodeling in fish--a new fashion or an ancient secret? *J.Exp. Bio.* 210: 2403-2409.

164. Nilsson G. E., (2001). Surviving Anoxia With the Brain Turned On, *News Physiol. Sci.*, 16, 217-221.
165. Nilsson, H.C., Rosenberg, R., (1994). Hypoxic response of two marine benthic communities. *Marine Ecology Progress Series* 115, 209 – 217
166. Nordlie et al., (1996) Salinity relationships in a freshwater population of eastern mosquitofish. *Journal of Fish Biology* 49, 1226–1232.
167. Nordlie, F., (1987). Salinity tolerance and osmotic regulation in the diamond killifish, *Adinia xenica*. *Env. Biol. Fish.* 20, 229–232.
168. Nordlie, F.G., Szelistowski, W.A., Nordlie, W.C., (1982). Ontogenesis of osmotic regulation in the striped mullet, *Mugil cephalus* L. *J. Fish Biol.* 20, 79 – 86.
169. Okino, S.T., Chichester, C.H., Whitlock Jr., J.P., (1998). Hypoxia-inducible mammalian gene expression analyzed in vivo at a TATA-driven promoter and at an initiator-driven promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 23837–23843.
170. Paerl, H.W., (2004). Estuarine eutrophication, hypoxia and anoxia dynamics: causes, consequences and controls, pp. 35-56. In, Rupp, G.L. and M.D. White. *Proceedings of the 7th International Symposium on Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality*. May 12-15, 2003, Tallin, Estonia. U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development, Ecosystems Research Division, Athens, Georgia, USA. EPA/600/R-04/049.
171. Paerl HW., Dennis RL, Whitall DR., (2002). Atmospheric deposition of nitrogen: implications for nutrient over-enrichment of coastal waters. *Estuaries*; 25:677–93.
172. Palachek, R. M.; Tomasso, J. R., (1984). Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and large-mouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 1739-1744.
173. Palumbo, A., (2005). Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol* 142A, 241-248.
174. Parry, G., (1958). Size and osmoregulation in salmonid fishes. *Nature* 181.
175. Perera, W.M., Carter, C.G., Houlihan, D.F., (1995). Feed consumption, growth and growth efficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) fed on diets containing a bacterial single-cell protein. *Br. J. Nutr.* 73, 591–603.
176. Perrone S.J., Meade T.L., (1977): Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34, 486–492.



177. Person, J, Mahe K, Le Bayon, N, Le Delliou, H. (2004). Effect of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, *Aquaculture* 237, 269-280.
178. Perry, S.F., (1997). The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 325-347.
179. Perry, S.F., Goss, G.G., Laurent, P., (1992). The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in 4 fresh-water teleosts. *Can. J. Zool.* 70, 1775–1786.
180. Perry, S. F.; Payan, P.; Girard, J. P. (1984). The effects of perfusate  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{PCO}_2$  on chloride uptake in perfused gills of rainbow trout. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 41, 1768-1773.
181. Petersen, M.G., Dewilde, S., Fago, A, (2008). Reactions of ferrous neuroglobin and cytoglobin with nitrite under anaerobic conditions, *J. Inorg. Biochem.* 102, 1777–1782.
182. Philips S., Laanbroek HJ, Verstraete W. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments, (2002). *Rev Environ Sci Biotechnol*; 1:115–41.
183. Plaut, I., (2000). Resting metabolic rate, critical swimming speed, and routine activity of the Euryhaline Cyprinodontid, *Aphanius dipar*, acclimated to a wide range of salinities. *Physiol. Biochem. Zool.* 73, 590–596.
184. Plaut, I., Gordon, M.S., (1994). Swimming metabolism of wild-type and cloned zebrafish *Brachydanio rerio*. *J. Exp. Biol.* 194, 209-223.
185. Portner H. O., Mark F. C., Bock C., (2004). Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answer obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respir Physiol Neurobiol.* 141:243-260.
186. Raffin, J. P., and C. Leray., (1980). Comparative study on AMP deaminase in gill, muscle and blood of fish. *Comp. Biochem Physiol.* 67B:533–540.
187. Rahmatullah, M., Boyde, T.R., (1980). Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation. *Clin. Chim. Acta* 107, 3–9.
188. Randall, Warren Burggren, Kathleen French, (2002). *Fisiologia Animale*, Zanichelli.

189. Randall, D. J., Wood, C. M., Perry, S. F., Bergman, H. L., Maloiy, G. M. O., Mommsen, T. P. and Wright, P. A., (1989). Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment. *Nature* 337, 165–166.
190. Randall, D. J., and P. A. Wright. (1987). Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 3:107–120.
191. Rees, B. B., Boily, P. and Williamson, L. A. C., (2009). Exercise- and hypoxia-induced anaerobic metabolism and recovery: a student laboratory exercise using teleost fish. *Adv. Physiol. Educ.* 33: 72–77. doi:10.1152/advan.90188.2008.
192. Rodrigues Edson , Miguez Ana Cristina, Teixeira Ribeiro and Bacila Metry., (2006). L-Arginine Metabolism in Mitochondria Isolated From the Liver of Antarctic Fish *Notothenia rossii* and *Notothenia neglecta*. *Brazilian archives of biology and technology, Aninternational journal* Vol.49, n. 5 : pp. 825-833.
193. Rosenberg, R., Hellman, B , Johansson , B., (1991) . Hypoxic tolerance of marine benthic fauna *Mar Ecol. Prog. Ser.* 79: 127-131.
194. Rychly, J., Marina, B.A., (1977). The ammonia excretion of trout during a 24-hour period. *Aquaculture* 11, 173–178.
195. Russo R.C., Thurston R.V., (1991). Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Brune D.E., Tomasso J.R. (eds.): *Aquaculture and Water Quality*. World Aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana. 58–89.
196. Russo RC., (1985). Ammonia, nitrite and nitrate In: Rand GM, Petrocelli SR, editors. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington DC: Hemisphere Publishing Corporation;. p. 455–71.
197. Russo RC, Thurston RV, Emerson K., (1981). Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effects of pH, nitrite species, and anion species. *Can J Fish Aquat Sci*;38:387–93.
198. Saha N, Ratha BK., (1987). Active ureogenesis in a freshwater airbreathing teleost, *Heteropneustes fossilis*. *J Exp Zool*;241:137–41.
199. Schoffeniels, E. (1976). Adaptations with respect to salinity. *Biochem. Soc. Symp.* 41: 179-204
200. Schreck, C. B., (1990). Physiological, behavioral, and performance indicators of stress, *American fisheries symposium* 8; 29-37.
201. Scott G, Crunkilton RL., (2000). Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* *Environ Toxicol Chem*; 19:2918–22.

202. Selye H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138:32-34.
203. Park, I.S., (2007). Acute Toxicity and Sublethal Effects of Nitrite on Selected Hematological Parameters and Tissues in Dark-banded Rockfish, *Sebastes inermis*, *Journal Of The World Aquaculture Society*, 8, 188-199.
204. Sharma B, Ahlert RC., (1977). Nitrification and nitrogen removal. *Water Res*;11: 897–925.
205. Shechter, H., Gruener, N., Shuval, H., I., (1972). A micromethod for determination nitrite in Blood. *Analytica Chimica Acta*, 93-99.
206. Shiva, S., Huang, Z., Grubina, R., Sun, J., Ringwood, L.A., MacArthur, P.H, Xu, X., Murphy, E., Darley-Usmar V.M., Gladwin M.T., (2007). Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration, *Circ. Res.* 100, 654–661.
207. Smith VH., (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global, problem. *Environ Sci Pollut R* ;10:126–39.
208. Solorzano, L., (1969). Determination of ammonia in natural waters by phenol hypochlorite method . *Limnology and Oceanography*, 14: 799-801.
209. Spagnuolo, C. Rinelli, P. Coletta, M., Chiancone, E., Ascoli, F., (1987). Oxidation reaction of human oxyhemoglobin with nitrite: a reexamination, *Biochimica et Biophysica Acta* 911, 59-65.
210. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 83, 13–34.
211. Steele, S. L., Yancey, P. H., and Wright, P. A., (2005). The little skate *Raja erinacea* exhibits an extrahepatic ornithine urea cycle in the muscle and modulates nitrogen metabolism during low-salinity challenge. *Physiol. Biochem. Zool.* 78, 216–226.
212. Steffensen J, Farrell AP., (1998). Swimming performance, venous oxygen tension and cardiac performance of coronary-ligated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to progressive hypoxia. *Comp Biochem Physiol A* 119:585–592.
213. Stormer, J., Jensen, F.B., Rankin, J.C., (1996). Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53 1943–1950.
214. Suresh, A.V., Lin, C.K., (1992). Tilapia culture in saline waters: a review. *Aquaculture* 106, 201– 226.

215. Svobodova, Z., Machova, J., Poleszczuk, G., Huda, J., Hamackova, J., Kroupova, H., (2005). Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. *Acta Vet. Brno* 74, 129–137.
216. Tam, W. L., Wong, W. P., Loong, A. M., Hiong, K. C., Chew, S. F., Ballantyne, J. S. and Ip, Y. K. (2003). The osmotic response of the Asian freshwater stingray (*Himantura signifier*) to increased salinity: a comparison to a marine (*Taeniura lymma*) and Amazonian freshwater (*Potamotrygon motoro*) stingrays. *J. Exp. Biol.* 206, 2931–2940.
217. Taylor EW, Barrett DJ., (1985). Evidence of a respiratory roe for the hypoxic bradycardia in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp Biochem Physiol.* 80:99-102.
218. Terjesen, B.F., (2008). Nitrogen excretion. In: Finn, R., Kapoor, B. (Eds.), *Fish Larval Physiology*. Science Publishers. In press, New York.
219. Terjesen, B.F., Chadwick, T.D., Verreth, J.A.J., Rønnestad, I., Wright, P.A., (2001). Pathways for urea production during early life of an air-breathing teleost, the African catfish *Clarias gariepinus* Burchell. *J. Exp. Biol.* 204, 2155 – 2165.
220. Tilak K.S., Veeraiah, K., Milton, P. R., (2007). Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus), *Journal of Environmental Biology*, 28(1) 45-47.
221. Tota, B., Imbrogno, S, Mazza, R., Gattuso, A., (2007). NOS distribution and NO control of cardiac performance in fish and amphibian hearts, in: B. Tota, B. Trimmer (Eds.), *Advances in Experimental Biology*, vol. 1, Nitric Oxide, Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 311–338.
222. Tulli F., Vachot C., Tibaldi E., Fournier V., Kaushik S.J., (2007). Contribution of dietary arginine to nitrogen utilisation and excretion in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets differing in protein source. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147, 179–188.
223. Van den Thillart, G., (1982). Adaptations of fish energy metabolism to hypoxia and anoxia. *Mol. Physiol.* 2: 49–61.
224. Van Den Thillart, G., V. Berge-Henegouwen and F. Kesbeke. (1983). Anaerobic metabolism of goldfish , *Carassius auratus* (L.): Ethanol and CO<sub>2</sub> excretion rates and anoxia tolerance at 20, 10 and 5°C. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 76:295-300.

226. Van den Thillart, G., F. Kesbeke, and A. V. Waarde. (1976). Influence of anoxia on the energy metabolism of goldfish *Carassius auratus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 55A: 329–336.
227. Van Waarde, A., De Graaff, I., Van Den Thillart, G., Erkelens, C., (1991). Acidosis (measured by nuclear magnetic resonance) and ethanol production in anoxic goldfish acclimated to 5 and 20°C. *J. exp. Biol.* 159, 387-405.
228. Van Waarde A., (1983). Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp Biochem Physiol* 74B:675–684.
229. Van Waversveld, J., Addink, A.D.F., van den Thillart, G., (1989). Simultaneous direct and indirect calorimetry on normoxic and anoxic goldfish. *J. Exp. Biol.* 142, 325–335.
230. Varsamos, et al., (2005). Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 141 401– 429.
231. Virani N, Rees BB., (2000). Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 126: 397–405
232. Zachariasen F., (2001). Intraspecific differences in nitrite tolerance of rainbow trout. The role of gill and kidney. [Cand. Scient. Thesis.] Institute of Biology, University of Southern Denmark, Odense Zweier, J. L., Samouilov, A. and Kuppasamy, P. (1999). Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 250-262.
233. Walsh, P. J. (1997). Evolution and regulation of ureogenesis and ureotely in (batrachoidid) fishes. *Ann. Rev. Physiol.* 59, 299–323.
234. Walsh, P. J. and Milligan, C. L., (1995). Effects of feeding and confinement on nitrogen metabolism and excretion in the gulf toadfish *Opsanus beta*. *The Journal of Experimental Biology* 198, 1559–1566.
235. Walsh, P. J. and Mommsen, T. P. (2001). Evolutionary considerations of nitrogen metabolism and excretion. In “Nitrogen excretion”, Wright P.J, Anderson P., eds., *Physiol. Physiology series*, vol. 20, 1-26.
236. Walters, D.M., Byron, J.F., (2000). Distribution of *Gambusia* (Poeciliidae) in a southeastern river system and the use of fin ray counts for species determination. *Copeia* 2, 555–559.
237. Walton, M. J., and C. B. Cowey, (1977). Aspects of ammonio- genesis in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem Physiol.* 57B:143–149.

238. Wang, X., L. Wu, M. Aouffen, M.A. Mateescu, R. Nadeau and R. Wang. 1999. Novel cardiac protective effects of urea: from shark to rat. *British Journal of Pharmacology* 128:1477-1484.
239. Watanabe, W.O., Ellingson, L.J., Wicklund, R.I., Olla, B.L., (1988). The effects of salinity on growth, food consumption and conversion in juvenile, monosex male Florida red tilapia. In: Pullin R. S. V., Bhukaswan T.
240. Watanabe, W.O., Kuo, C.M., Huang, M.C., (1985). The ontogeny of salinity tolerance in the tilapias *Oreochromis aureus*, *O. niloticus*, and an *O.mossambicus*\_*O. niloticus* hybrid, spawned and reared in fresh water. *Aquaculture* 47, 353– 367.
241. .Weihrach,, D, Wilkie, M. P., . Walsh, P.J., (2008). Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans, *The Journal of Experimental Biology* 212, 1716-1730.
242. Wetzel RG., (2001). *Limnology*. 3rd edition. New York: Academic Press.
243. White, C.R., Phillips, N.F., Seymour, R.S., (2006). The scaling and temperature dependence of vertebrate metabolism. *Biol. Lett.* 2, 125–127.
244. Wieser W, Kaufmann R (1998). A note on interactions between temperature, viscosity, body size and swimming energetics in fish larvae. *J. Exp. Biol.* 201:1369.
245. Wilkie MP., (1997). Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comp Biochem Physiol* 118A:39–50.
246. Williams, E.M., Eddy, F.B., (1988). Anion transport, chloride cell number and nitrite-induced methaemoglobinaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* 13, 29–42.
247. Williams, E. M.; Eddy, F. B., (1986). Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol.*, 156B, 867-872.
248. Willmer, P., Graham and Johnston, (2000) *Fisiologia ambientale degli animali*, Zanichelli.
249. Winkler, P., (1979). Thermal preference of *Gambusia affinis affinis* as determined under field and laboratory conditions. *Copeia* 1, 60–64.
250. Woo, N. Y. S., (1997). Metabolic and Osmoregulatory Responses of the Sea Bass *Lates calcarifer* to Nitrite Exposure. *Metabolic and Osmoregulatory Responses*, 257-264.
251. Wood CM., (1993). Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evans DH, editor. *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC Press. p 379–425.
252. Wright, P. A., (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* 198, 273-281.

253. Wright, P. A., Felskie, A. and Anderson, P. M., (1995). Induction of ornithine–urea cycle enzymes and nitrogen metabolism and excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during early life stages. J. Exp. Biol. 198, 127–135.
254. Wright PA, Iwama GK, Wood CM., (1993). Ammonia and urea excretion in Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) adapted to highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4). J Exp Biol 175:153–172.
255. Wright, P. A., Randall, D. J. and Perry, S. F., (1989). Fish gill water boundary layer: a site of linkage between carbon dioxide and ammonia excretion. J. Comp. Physiol. 158B, 627-635.
256. Wu, R. S.S., (2002). Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses, Marine Pollution Bulletin 45, 35–45.
257. Wu, C. and S. Morris., (1998). Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. Biochemical Journal 336:1-17.
258. [www.apat.gav.it](http://www.apat.gav.it)
259. [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)
260. Xiao, S., L. Wagner, J. Mahaney and C. Baylis. 2001. Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 280:F989-95.
261. Yancey, P.H., Blake, W., Conley, J., (2002). Unusual organic osmolytes in deepsea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. Comp. Biochem. Physiol. A 133, 667–676.
262. Zydlewski, J., McCormick, D., (2001). Developmental and environmental regulation of chloride cells in young American shad, *Alosa sapidissima*. J. Exp. Zool. 290, 73–87.